

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
17. Oktober 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/080979 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 47/48**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP02/02928**

(22) Internationales Anmeldedatum:  
15. März 2002 (15.03.2002)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:  
101 12 825.8 16. März 2001 (16.03.2001) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): **FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND GMBH**  
[DE/DE]; Freseniusstrasse, 61159 Friedberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SOMMERMEYER, Klaus** [DE/DE]; In der Laubach 26, 61191 Rosbach (DE). **EICHNER, Wolfram** [DE/DE]; Richard Wagner Str. 12, 35510 Butzbach (DE). **FRIE, Sven** [DE/DE]; Heuchelheimerstr. 12, 61348 Friedberg (DE). **JUNGHEINRICH, Cornelius** [DE/DE]; Valkenierstr. 2b, 61350 Bad Homburg (DE). **SCHARPF, Roland** [DE/DE]; Vogelsbergstr. 3, 63691 Ranstadt (DE). **LUTTERBECK, Katharina** [DE/DE]; Am Holzpförtchen 7, 61169 Friedberg (DE).

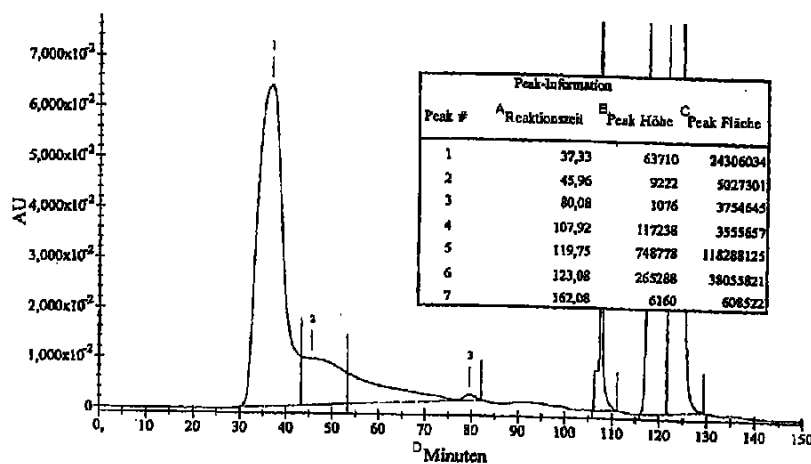
(74) Anwälte: **VON MENGES, A.** usw.; Uexkill & Stolberg, Beselerstr. 4, 22607 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: **CONJUGATE OF HYDROXYALKYL STARCH AND AN ACTIVE AGENT**

(54) Bezeichnung: **HAS-WIRKSTOFF-KONJUGATE**



<sup>E</sup>GPC Chromatogramm der Kopplung III ox-HES 130 kD an HSA

A...REACTION TIME  
B...HEIGHT  
C...AREA  
D...MINUTES  
E...GPC CHROMATOGRAM OF THE COUPLING OF III OX-HES 130KD TO HAS

(57) Abstract: The invention relates to compounds, comprising a conjugate of hydroxyalkyl starch (HAS) and an active agent, whereby the hydroxyalkyl starch is either directly covalently bonded to the active agent, or by means of a linker. The invention further relates to methods for the production of a covalent HAS-active agent conjugate, whereby HAS and an active agent are reacted in a reaction medium, characterised in that the reaction medium is water or a mixture of water and an organic solvent, comprising at least 10 wt. % water.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/080979 A2



KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

- (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

---

**(57) Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen, die ein Konjugat aus Hydroxalkylstärke (HAS) und einem Wirkstoff umfassen, wobei die Hydroxalkylstärke entweder unmittelbar oder über einen Linker kovalent an den Wirkstoff gebunden ist. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Herstellung eines kovalenten HAS-Wirkstoff-Konjugates, bei denen man HAS und einen Wirkstoff in einem Reaktionsmedium miteinander umsetzt, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsmedium Wasser oder ein Gemisch von Wasser mit organischem Lösungsmittel, welches mindestens 10 Gew.-% Wasser umfasst, ist.

### HAS-Wirkstoff-Konjugate

Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen, die ein Konjugat aus einer Hydroxyalkylstärke (HAS) und einem Wirkstoff umfassen, wobei die Hydroxyalkylstärke entweder unmittelbar oder über einen Linker kovalent an den Wirkstoff gebunden ist. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Herstellung eines kovalenten HAS-Wirkstoff-Konjugates, bei denen man HAS und einen Wirkstoff in einem Reaktionsmedium miteinander umsetzt, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsmedium Wasser oder ein Gemisch von Wasser mit organischem Lösungsmittel, welches mindestens 10 Gew.-% Wasser umfaßt, ist. Die Erfindung betrifft auch die medizinische Verwendung der Konjugate.

### TECHNISCHER HINTERGRUND

Der klinische Einsatz vieler Pharma-Wirkstoffe wird durch eine Reihe von Problemen beeinträchtigt (vgl. Delgado et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, Vol. 9 (3, 4), (1992) S. 249-304). Parenteral verabreichte native Proteine unterliegen beispielsweise der Ausscheidung durch das retikulo-

- 2 -

endotheliale System, die Leber, die Niere und die Milz. Die Ausscheidung erfolgt dabei in Abhängigkeit der Ladung der Kohlenhydratketten, der Präsenz zellulärer Rezeptoren für das Protein und von der Molekülform und -größe. Die Ausschlussgrenze der Glomerularfiltration der Niere liegt beispielsweise bei etwa 67 kD.

Als Folge proteolytischer Degradation ist ferner ein schneller Verlust der biologischen Aktivität zu beobachten.

- 5 Bakteriell exprimierte Proteine sowie andere rekombinante Proteine können eine erhöhte Immunogenität aufweisen und lebensbedrohliche Hypersensitivitätsreaktionen provozieren. Entsprechende Reaktionen verhindern natürlich die medizinische Verwendung dieser Produkte.

10

- Aus diesem Grund wurde im Stand der Technik bereits seit Ende der 70er Jahre systematisch an der Verbesserung der Eigenschaften exogener Proteine durch chemische Modifikation, insbesondere Polymerisation oder Kopplung an makromolekulare Polymere  
15 geforscht. Viele Arbeiten konzentrierten sich dabei auf die Herstellung von Konjugaten aus Proteinen oder anderen Wirkstoffen einerseits und Polyethylenglykol (PEG) andererseits (vgl. US 4,179,337). Die Vorteile, die man sich von diesen Kopplungsreaktionen erhoffte, umfassen verbesserte in vivo Halbwertszeit  
20 der Proteine, verringerte Toxizität, verbesserte Stabilität und verbesserte Löslichkeit der Wirkstoffe (Abuchowski und Davis, Enzymes as drugs, Holcenberg und Rubberts, Herausgeber, S. 367-383, John Wiley & Sons N.Y. (1981)).

- 25 Das Verfahren zur Kopplung der Wirkstoffe erwies sich jedoch als problematisch, da die aktive Gruppe des Proteins durch Kopplung an PEG inaktiviert wurde oder die Reaktionen das Reaktionsprodukt nicht in brauchbarer Ausbeute lieferten. Um eine spezifische Bindung zu erzielen, die die Aktivität des Wirkstoffs nicht  
30 beeinträchtigt, wurden aktive Gruppen in PEG oder den Wirkstoff eingeführt oder die Verbindungen mit einem Linker aneinander

- 3 -

gebunden. Üblicherweise wird PEG dafür mit einer aktiven Gruppe versehen, welche nachfolgend kovalent an die kopplungsfähige Gruppe eines Proteins gebunden wird.

- 5 So wurde beispielsweise der Verlust der Bindungsaktivität von Antikörpern und deren Fragmenten nach deren Kopplung an PEG beschrieben (Kitamura et al., Cancer Res., Vol. 51 (1991), S. 4310-4315; und Pedley, et al., Br. J. Cancer, Vol. 79 (1994), S. 1126-1130). Zur Lösung dieses Problems schlagen Chapman et al.  
10 (Nature Biotech., Vol. 17 (1999), S. 780-783) vor, PEG an bestimmte Bindungsstellen des Antikörpers zu binden.

Der Aktivitätsverlust des Kopplungspartners wird ferner in WO 95/13090 beschrieben. Zur Lösung wird vorgeschlagen, PEG mit  
15 einer reaktiven Gruppe zu aktivieren und PEG über diese reaktive Gruppe in Gegenwart eines Tensides an  $\alpha$ -Interferon zu binden. Als bevorzugte reaktive Gruppe wird N-Succinimid-Carbonat genannt, das unter den genannten Bedingungen mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysin eine Urethan-Bindung ausbilden soll.

20

Auch die WO 96/41813 offenbart Verfahren zur Herstellung eines Polymer-Polypeptid-Konjugates, bei denen das Polymer (insbesondere PEG) an einer spezifischen Stelle derivatisiert und anschließend an ein Polypeptid gebunden wird. Vorzugsweise wird  
25 dabei eine Amino-Oxi-Acetyl-Gruppe in PEG eingebracht und diese Verbindung anschließend an ein Polypeptid, insbesondere an IL-8, hG-CSF und IL-1 gebunden.

In der Literatur finden sich somit eine Vielzahl von Beispielen  
30 für entsprechende Konjugate; vgl. PEG-Insulin-Konjugate in US 4,179,337, bovine PEG-Hämoglobin-Konjugate in US 4,412,989, PEG-Ribonuklease-Konjugate und PEG-Superoxiddismutase-Konjugate in Veronese et al., Applied Biochem. Biotech., Vol. 11, 141-152 (1995), PEG-IL-2-Konjugate oder PEG-IFN- $\beta$ -Konjugate in US  
35 4,766,106, PEG-Polymyxin-Konjugate in WO 90/15628 und PEG-IL-2-Konjugate in WO 90/07939. Einige Konjugate befinden sich inzwischen in der klinischen Anwendung. Beispielsweise konnten die

- 4 -

Eigenschaften des Enzyms Asparaginase durch Konjugatbildung mit PEG verbessert werden, und ein PEG-Asparaginase-Konjugat ist unter der Marke Oncaspar<sup>®</sup> für die Krebstherapie kommerziell erhältlich. Kürzlich wurde ein an PEG gekoppeltes G-CSF von der  
5 US Food and Drug Administration zugelassen (Pegfilgastim). Eine große Anzahl weiterer pegylierter Produkte befindet sich in den verschiedenen Phasen der klinischen Entwicklung, darunter beispielsweise PEG-CDP870, PEG-Dronabinol, etc. (vgl. PEG-Pipeline unter [www.enzon.com](http://www.enzon.com) oder [www.inhale.com](http://www.inhale.com)).

10

Nicht nur Proteine sondern auch andere Verbindungen wurden nach diesem Schema an PEG und andere Polymere gekoppelt. WO 97/33552 und WO 97/38727 offenbaren beispielsweise die Kopplung von Paclitaxel an PEG und die Verwendung des Konjugates zur Behand-  
15 lung von Tumoren. Die Verwendung eines PEG-Camptothecin-Konjugates zur Behandlung von Tumoren wird von der Firma Enzon in der klinischen Phase I untersucht.

Auch Antibiotika sind bereits an PEG gekoppelt worden. Dowling  
20 und Russell berichten beispielsweise über die Pharmakokinetik eines Oxytetracyclin-PEG-Konjugates (J. Vet. Pharmacol. Ther., Vol. 23 (2000), 107-110). Für den Erhalt neuer Funktionen wurden Antibiotika im Stand der Technik auch mittels anderer Verfahren derivatisiert. Beispielsweise wurde ein Depot-Penicillin herge-  
25 stellt, welches ein Procain-Penicillin-Derivat ist, also das Salz des Penicillins mit der Procain-Base. Dieses Derivat besitzt eine verlängerte Wirkungsdauer und wird z.B. zur Therapie der Syphilis eingesetzt.

30 Kopplungsreaktionen mit mehr als zwei Verbindungen sind ebenfalls beschrieben worden. WO 93/23062 offenbart beispielsweise die Herstellung eines Kopplungsproduktes aus einem gegen ein B-Zell-Lymphom gerichteten Antikörper, aktiviertem PEG und einem Toxin.

35 PEG-Wirkstoff-Konjugate weisen jedoch keine natürliche Struktur auf, für die in vivo Abbauege beschrieben wurden. Unter anderem aus diesem Grund sind neben den PEG-Konjugaten auch andere

- 5 -

Konjugate und Protein-Polymerisate für die Lösung der oben genannten Probleme erzeugt worden. So gibt es eine Vielzahl von Verfahren zur Vernetzung verschiedener Proteine und Bindung von Proteinen an Makromoleküle (vgl. zusammenfassende Darstellung in  
5 Wong, S.S., "Chemistry of protein conjugation and cross linking", CRC Press, Inc. (1993)).

Hydroxyethylstärke (HES) wird als Derivat eines natürlich vorkommenden Amylopektins im Körper durch  $\alpha$ -Amylase abgebaut.  
10 Auch die Herstellung von HES-Protein-Konjugaten ist bereits im Stand der Technik beschrieben worden (vgl. HES-Hämoglobin-Konjugate in DE 26 16 086 oder DE 26 46 854).

Hämoglobin ist ein Protein, das als Blutersatz- und Sauerstoff-transport-Mittel (sog. "Hämoglobin-Based-Oxygen Carrier", HBOC) eine große klinische Bedeutung haben könnte. Obgleich der Bedarf an einem derartigen Produkt jedoch bereits frühzeitig erkannt wurde (vgl. Rabiner, J. Exp. Med. 126, (1967) 1127), hat bisher keines der bekannten HBOC-Produkte den Status eines zugelassenen  
20 Arzneimittels erreicht.

Das natürliche Hämoglobin besteht aus zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptidketten, die als prosthetische Gruppe jeweils ein Häm gebunden haben. Isolierte Hämoglobin-Moleküle sind jedoch sehr instabil und zerfallen rasch in die stabileren  $\alpha$ , $\beta$ -Dimere (MG 32 kDa). Die biologische Halbwertszeit von isoliertem Hämoglobin im Blutkreislauf liegt bei etwa 1 Stunde, da die Dimere schnell über die Nieren ausgeschieden werden. Dabei erzeugen die Dimere nephrotoxische Nebenwirkungen (vgl. Bunn & Jandl, J. Exp. Med. 129, (1967) 925-  
25 934). Entwicklungsarbeiten an derivatisierten Hämoglobin-Molekülen waren daher in erster Linie darauf gerichtet, Hämoglobin intramolekular zu vernetzen, zur Bildung von polymeren HBOC-Formen intermolekular zu verknüpfen und/oder an Polymere zu koppeln.

35

Die bekannten Hämoglobin-Konjugate werden beispielsweise in Xue und Wong (Meth. in Enzymol., 231 (1994), S. 308-322) und in DE

- 6 -

26 16 086 und DE 26 46 854 beschrieben. Letztere offenbart Verfahren mittels derer Hämoglobin an HES gebunden wird, indem HES zunächst mit Natriumperiodat umgesetzt wird. Dabei entstehen Dialdehyde, an die Hämoglobin gebunden wird. Demgegenüber  
5 beschreibt die DE 26 16 086 die Kopplung von Hämoglobin an HES nach einem Verfahren, bei dem zunächst ein Vernetzungsmittel (z.B. Bromcyan) an HES gebunden wird und anschließend Hämoglobin an das Zwischenprodukt gebunden wird.

- 10 HES ist ein substituiertes Derivat des in Maisstärke zu 95 % vorkommenden Kohlenhydrat-Polymers Amylopektin. HES weist vorteilhafte rheologische Eigenschaften auf und wird zurzeit als Volumenersatzmittel und zur Hämodilutionstherapie klinisch eingesetzt (Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie, Vol. 8(8),  
15 (1987), S.271-278; und Weidler et al., Arzneim.-Forschung/ Drug Res., 41, (1991) 494-498).

Amylopektin besteht aus Glucoseeinheiten, wobei in den Hauptketten  $\alpha$ -1,4-glykosidische Bindungen vorliegen, an den Verzweigungsstellen jedoch  $\alpha$ -1,6-glykosidische Bindungen. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieses Moleküls werden im Wesentlichen durch die Art der glykosidischen Bindungen bestimmt. Aufgrund der abgeknickten  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindung entstehen helikale Strukturen mit etwa 6 Glucose-Monomeren pro Windung.  
20

25 Die physikalisch-chemischen als auch die biochemischen Eigenschaften des Polymers können durch Substitution verändert werden. Die Einführung einer Hydroxyethylgruppe kann durch alkalische Hydroxyethylierung erreicht werden. Durch die Reaktionsbedingungen kann die unterschiedliche Reaktivität der jeweiligen  
30 Hydroxylgruppe im unsubstituierten Glucosemonomer gegenüber der Hydroxyethylierung ausgenutzt werden, dadurch ist eine begrenzte Einflussnahme auf das Substitutionsmuster möglich.

35 Daher wird HES im Wesentlichen über die Molekulargewichtsverteilung und den Substitutionsgrad gekennzeichnet. Der Substitutionsgrad kann dabei als DS ("degree of substitution"),



- 7 -

welcher auf den Anteil der substituierten Glucosemonomere aller Glucoseeinheiten Bezug nimmt, oder als MS ("molar substitution") beschrieben werden, womit die Anzahl von Hydroxyethylgruppen pro Glucoseeinheit bezeichnet wird.

5

HES-Lösungen liegen als polydisperse Zusammensetzungen vor, in denen sich die einzelnen Moleküle hinsichtlich des Polymerisationsgrades, der Anzahl und Anordnung der Verzweigungsstellen, sowie ihres Substitutionsmusters voneinander unterscheiden. HES  
10 ist somit ein Gemisch von Verbindungen mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Dementsprechend wird eine bestimmte HES-Lösung durch ein durchschnittliches Molekulargewicht anhand statistischer Größen bestimmt. Dabei wird  $M_n$  als einfaches arithmetisches Mittel in Abhängigkeit von der Anzahl der Moleküle  
15 errechnet (Zahlenmittel), während  $M_w$ , das Gewichtsmittel, die masseabhängige Messgröße darstellt.

Eine selektive chemische Bindung von Proteinen an HES wurde bisher jedoch dadurch verhindert, dass die Aktivierung der HES  
20 nicht selektiv erfolgt. So resultieren die im Stand der Technik bekannten Protein-HES-Konjugate aus einer nicht-selektiven Kopplung von Bromcyan-aktivierter HES an Hämoglobin (vgl. DE 26 16 086). Entsprechende Verfahren können zu polydispersen Produkten mit uneinheitlichen Eigenschaften und potentiell  
25 toxischen Nebenwirkungen führen.

Von Hashimoto (Hashimoto et al., Kunststoffe, Kautschuk, Fasern, Vol. 9, (1992) S. 1271-1279) wurde erstmals ein Verfahren offenbart, in dem eine reduzierende Aldehyd-Endgruppe eines  
30 Saccharids selektiv oxidiert werden konnte, wobei ein reaktiver Ester (Lacton) gewonnen wurde.

Auf der Grundlage dieses Verfahrens offenbart WO 98/01158, dass Hämoglobin-Hydroxyethylstärke-Konjugate erhalten werden können,  
35 in denen Hämoglobin an HES selektiv über Amidbindungen zwischen freien Aminogruppen des Hämoglobins und der in oxidierten Form vorliegenden reduzierenden Endgruppe der HES miteinander

- 8 -

verknüpft sind. Sowohl die in Hashimoto et al. offenbarten Verfahren als auch die Verfahren gemäß WO 98/01158 basieren jedoch auf einer Reaktion zwischen Saccharid (HES) und Protein (Hämoglobin) in organischem Lösungsmittel. Konkret wurde in  
5 dieser Veröffentlichung Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet.

Dem Fachmann ist jedoch bekannt, dass viele Proteine in organischen Lösungsmitteln eine Strukturänderung erleiden, welche sich in wässrigen Lösungen nicht zurückbildet. In der Regel geht mit  
10 der Strukturänderung auch ein Aktivitätsverlust einher. In jedem Fall ist das organische Lösungsmittel aufwendig zu entfernen, da für die geplante medizinische Verwendung bereits residuale Anteile organischer Lösungsmittel nicht akzeptabel sein können. Sogar die potentielle Gefahr von Verunreinigungen und  
15 Strukturänderungen der Proteine ist im Hinblick auf die geplante Verwendung auszuschliessen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, verbesserte Hydroxyalkylstärke-Wirkstoff-Konjugate und Verfahren  
20 zur deren Herstellung zur Verfügung zu stellen, die zu biologisch aktiven Konjugaten führen, welche im klinischen Alltag eingesetzt werden können. Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Herstellung von Hydroxyalkylstärke-Wirkstoff-Konjugaten bereit zu stellen, bei denen nicht  
25 in nennenswertem Umfang Nebenprodukte erzeugt werden, da auch diese Nebenprodukte die anschließende Aufreinigung des Produktes in erheblichem Umfang beeinträchtigen.

Diese Aufgabe wurde nunmehr überraschenderweise durch Verbindungen gelöst, die ein Konjugat aus einer Hydroxyalkylstärke und einem Wirkstoff umfassen, wobei die Hydroxyalkylstärke  
30 entweder unmittelbar oder über einen Linker kovalent an den Wirkstoff gebunden ist. Entsprechende HAS-Wirkstoff-Konjugate sind beispielsweise durch Verfahren erhältlich, bei denen man HAS  
35 und einen Wirkstoff in einem Reaktionsmedium miteinander umsetzt, wobei das Reaktionsmedium Wasser oder ein Gemisch von Wasser mit

- 9 -

organischem Lösungsmittel, welches mindestens 10 Gew.-% Wasser umfaßt, ist.

Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Herstellung eines  
5 kovalenten HAS-Wirkstoff-Konjugates, bei dem man HAS und  
mindestens einen Wirkstoff in einem wässrigen Reaktionsmedium  
miteinander umsetzt und ist dadurch gekennzeichnet, dass das  
Reaktionsmedium Wasser oder ein Gemisch von Wasser mit organi-  
10 schem Lösungsmittel, welches mindestens 10 Gew.-% Wasser umfaßt,  
ist.

Vorzugsweise wird HAS vor Bindung an den Wirkstoff oxidiert,  
wobei eine spezifische Oxidation der reduzierenden Endgruppen  
besonders bevorzugt ist. Alternativ dazu kann die Kopplung über  
15 die Bildung einer Schiff'schen Base zwischen HAS und einem Amin-  
Gruppen-tragenden Wirkstoff als Zwischenprodukt erfolgen. Dieses  
Zwischenprodukt wird anschließend unter Ausbildung einer  
Methylenaminingruppe reduziert.

20

#### KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN:

Fig. 1 GPC Chromatogramm der Kopplungsreaktion zwischen ox-HES  
130 kD und HSA nach Verfahren A.III;

25

Fig. 2 GPC Chromatogramm der Kopplungsreaktion zwischen ox-HES  
130 kD und HSA nach Verfahren A.IV;

Fig. 3 GPC Chromatogramm der Kopplungsreaktion zwischen ox-HES  
30 130 kD und HSA nach Verfahren A.V und einer Reaktionszeit  
von 2 Stunden;

Fig. 4 GPC Chromatogramm der Kopplungsreaktion zwischen ox-HES  
130 kD und HSA, Verfahren A.V, Reaktionszeit über Nacht;

35

- 10 -

Fig.5 GPC Chromatogramm der Kopplungsreaktion zwischen ox-HES 10 kD und HSA nach Verfahren A.V nach 2 Stunden (Fig. 5a) und über Nacht (Fig. 5b);

5 Fig. 6 GPC Chromatogramm der Kopplungsreaktion zwischen ox-HES 130 kD und HSA nach Verfahren A.VII, nach 24 Stunden Reaktionszeit;

10 Fig. 7 GPC Chromatogramm der Kopplungsreaktion zwischen ox-HES 130 kD und HSA nach Verfahren B.V;

Fig. 8 SDS-PAGE und Western Blot verschiedener Kopplungsreaktionen zwischen HES und HSA;

15 Fig. 9 SDS-PAGE und Western Blot verschiedener Kopplungsreaktionen zwischen HES und HSA;

Fig.10 Reaktionsschema für die Erstellung eines HES-DNA-Konjugates;

20

Fig.11 Aufnahme eines Gels, das HES-DNA-Konjugate vor und nach einem Verdau mit einem Restriktionsenzym zeigt.

Die vorliegende Erfindung stellt erstmals Verbindungen zur  
25 Verfügung, die ein Konjugat aus Hydroxyalkylstärke und einem Wirkstoff umfassen, wobei die Hydroxyalkylstärke entweder unmittelbar oder über einen Linker kovalent an den Wirkstoff gebunden ist. Die vorliegende Erfindung stellt ferner HAS-Wirkstoff-Konjugate zur Verfügung, welche durch Verfahren herstellbar sind,  
30 bei denen man HAS und mindestens einen Wirkstoff in einem wässrigen Reaktionsmedium miteinander umsetzt. Die Verfahren sind ferner dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsmedium Wasser oder ein Gemisch von Wasser mit organischem Lösungsmittel, welches mindestens 10 Gew.-% Wasser umfaßt, ist.

35

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird eine chemische Verbindung als Wirkstoff bezeichnet, wenn die Verbindung geeignet

- 11 -

ist, aktiver Bestandteil eines beliebigen Mittels für therapeutische oder diagnostische Zwecke zu sein. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Wirkstoff um ein den aktiven Bestandteil eines Arzneimittels, also die Verbindung innerhalb einer Arzneimittel-

5 formulierung, welche nach Verabreichung an ein Subjekt eine physiologische Wirkung erzielt.

Eine Übersicht über die zugelassenen Arzneimittel und deren Wirkstoffe findet sich in der Roten Liste. Die in der Roten Liste

10 genannten Wirkstoffe können für die Herstellung der HAS-Wirkstoff-Konjugate nach dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden. Gemäß der vorliegenden Erfindung umfaßt der Begriff Wirkstoff aber auch alle Verbindungen, deren Eignung für die diagnostische oder therapeutische Verwendung zwar bekannt ist,

15 die jedoch aufgrund der oben dargestellten Probleme bisher für diesen Zweck nicht eingesetzt werden konnten. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Wirkstoff um ein Vitamin, Impfstoff, Toxin, Antibiotikum (oder Antiinfektivum), Antiarrhythmikum, Appetitzügler, Anästhetikum, Analgetikum, Antirheumatikum,

20 Antiallergikum, Asthmatikum, Antidepressivum, Antidiabetikum, Antihistaminikum, Antihypertonikum, oder ein antineoplastisches Mittel. Strukturell kann es sich beispielsweise um ein Hormon, Steroid, Lipid, Protein, Oligo- oder Polypeptid, eine Nukleinsäure, insbesondere eine D- oder L-Nukleinsäure, wie beispielsweise

25 eine D-DNA, L-DNA, D-RNA oder L-RNA handeln. Die Verwendung von Proteinen, Peptiden, D- oder L-Nukleinsäuren als HAS-Kopplungspartner ist besonders bevorzugt.

Die nach der vorliegenden Erfindung hergestellten Verbindungen

30 behalten die Aktivität des Wirkstoffes und die vorteilhaften Eigenschaften der HAS. Als weitere Vorteile weisen die erfindungsgemäßen Konjugate weitere Vorteile, darunter eine verbesserte in vivo Halbwertszeit der Wirkstoffe, eine verringerte Toxizität, eine verbesserte Stabilität und/oder eine verbesserte

35 Löslichkeit der Wirkstoffe auf.

- 12 -

Die HAS-Kette wird im Plasma nach der Verabreichung durch alpha-Amylase verkürzt. Die Aktivität des Kopplungsproduktes kann somit als Aktivität des nativen Kopplungsproduktes, also unmittelbar nach der Kopplung, oder als Aktivität des metabolisierten Kopplungsproduktes, also nach in vivo Metabolisierung des Kopplungsproduktes, bestimmt werden. Die in vivo Metabolisierung kann durch einen in vitro Abbau simuliert werden.

Die Aktivität des Wirkstoffes kann nach im Stand der Technik für diesen Stoff bekannten Verfahren bestimmt werden. Bei einem antineoplastischen Mittel wird die Aktivität beispielsweise als inhibitorische Konzentration (IC) oder bei einem antiinfektiven Mittel als minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt. Die Bestimmung erfolgt vorzugsweise in vitro an geeigneten Zielzellen (vgl. Chow et al., Haematologica, Vol. 86 (2001), S. 485-493). Die in vitro Effekte können ferner durch ein relevantes Tiermodell bestätigt werden (vgl. beispielsweise das Mausmodell des Nierenzellkarzinoms, das in Changnon et al. beschrieben wurde, vgl. BJU Int., Vol. 88 (2001), S. 418-424).

Im Vergleich zu der ungekoppelten Substanz kann das native Kopplungsprodukt eine gesteigerte oder reduzierte Aktivität aufweisen. Die Aktivität wird jedoch vorzugsweise nicht mehr als 5fach, besonders bevorzugt nicht mehr als 3- oder 2-fach reduziert. Das metabolisierte Produkt weist vorzugsweise eine mit der ungekoppelten Substanz vergleichbare Aktivität auf, d.h. das metabolisierte Konjugat weist mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 75% der Aktivität des Wirkstoffes vor der Kopplung auf, wobei ein Erhalt von mindestens 95% der Aktivität besonders bevorzugt ist.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird der Begriff "Hydroxyalkylstärke" dazu verwendet, um Stärkederivate zu bezeichnen, die mit einer Hydroxyalkylgruppe mit 1 bis 3 C-Atomen substituiert wurden. Die als "Hydroxyalkylstärke" bezeichnete Gruppe umfaßt somit Hydroxymethylstärke, Hydroxyethylstärke und Hydroxypropylstärke. Die Verwendung von Hydroxyethylstärke (HES) als Kopp-

- 13 -

lungspartner ist für alle Ausführungsformen der Erfindung besonders bevorzugt.

Erfindungsgemäß ist es bevorzugt, dass die Hydroxyethylstärke ein  
5 mittleres Molekulargewicht (Gewichtsmittel) von 1-300 kDa, wobei  
ein mittleres Molekulargewicht von 5 bis 200 kDa besonders  
bevorzugt ist. Hydroxyethylstärke kann ferner einen molaren  
Substitutionsgrad von 0,1-0,8 und ein Verhältnis von C<sub>2</sub>:C<sub>6</sub>-  
10 Substitution im Bereich von 2-20, jeweils bezogen auf die Hy-  
droxyethylgruppen, aufweisen.

Für die Kopplung des Wirkstoffes an die HAS kann es in einem  
ersten Schritt notwendig sein, eine aktive Gruppe in den  
Wirkstoff und/oder in die HAS einzuführen. Entsprechende aktive  
15 Gruppen können beispielsweise Thiol- oder Aminogruppen sein (vgl.  
Beispiele).

Ferner können Wirkstoff und HAS unter Verwendung eines Linkers  
aneinander gekoppelt werden. Als Linker kann ein beliebiges  
20 Vernetzungsmittel eingesetzt werden. Zahlreiche Vernetzungs-  
mittel, wie beispielsweise SMCC (Succinimidyl-4-(N-maleimido-  
methyl)cyclohexan-1-carboxylat; vgl. Beispiel 7), sind kom-  
merziell erhältlich und dem Fachmann geläufig (vgl. alphabeti-  
sche Liste der "Cross-linking Reagents" im Produktkatalog der  
25 Firma Perbio und [www.piercenet.com](http://www.piercenet.com)).

Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind  
wasserlösliche, einen Aminosucker aufweisende Antibiotika-  
Derivate, insbesondere HAS-Daunorubicin und HAS-Doxorubicin-  
30 Konjugate, sowie Verfahren zu deren Herstellung, soweit in DE 101  
29 369 offenbart, nicht von der vorliegenden Erfindung umfaßt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende  
Erfindung Verbindungen, die ein Konjugat aus HAS und einem  
35 antineoplastischen Wirkstoff umfassen und deren Verwendung zur  
Behandlung von Tumoren.

- 14 -

Tumorzellen unterscheiden sich von normalen Körperzellen u.a. dadurch, daß die Tumorzellen einer physiologischen Wachstumskontrolle entzogen sind und daher eine gesteigerte Zellteilungsrate aufweisen. Die therapeutische Verwendung antineoplastischer Wirkstoffe bei der Tumorthherapie basiert auf diesem Unterschied, da sich die toxische Aktivität antineoplastischer Wirkstoffe primär gegen proliferierende Zellen richtet. Verbindungen werden daher als antineoplastische Wirkstoffe oder Zytostatika bezeichnet, wenn sie eine toxische Aktivität gegen proliferierende Zellen aufweisen (Grundlagen der Onkologie und gegenwärtige Therapieansätze werden beispielsweise in Internistische Onkologie, Schmoll et al. (Herausg.), Springer, 1996, zusammengefaßt).

Chemisch können die antineoplastischen Wirkstoffe einer sehr heterogenen Gruppe zugeordnet werden. Neben der Proliferationshemmung gewinnt in der Diskussion der letzten Jahre die Apoptoseinduktion, der programmierte Zelltod, an Bedeutung. Eine Klassifikation der antineoplastischen Wirkstoffe kann beispielsweise über die kritischen Zielmoleküle erfolgen (Schmoll et al., a.a.O.):

- (1) Verbindungen, welche die DNS-Biosynthese hemmen, beispielsweise durch Antimetaboliten, wie MTX, 5-FU, Ara-C oder Hydroxyharnstoff.
- (2) Verbindungen, welche auf die DNS einwirken, beispielsweise durch Induktion von Strangbrüchen, Interkalation, Veränderung der Zwischenstrangvernetzung, Topoisomerasegifte, wie Alkylantien, Platinkomplexe Anthrazykline, Bleomycin, Actinomycin D oder Epipodophyllotoxine.
- (3) Verbindungen, welche auf die RNS einwirken, beispielsweise durch Blockade der mRNA Synthese durch Interkalation oder Einbau in die RNS, darunter Anthrazykline, Bleomycin, Actinomycin D oder Antimetabolite.
- (4) Verbindungen, welche auf Proteine einwirken, beispielsweise auf der Ebene der Rezeptorbindung (z.B. Hormone oder Antagonisten), durch Inhibition der Tubulinpolymerisation (z.B. mittles Vincaalkaloiden), durch Proteinvernetzung



- 15 -

(z.B. mittels Alkylantien) oder Phosphorylierung (z.B. mittels Proteinkinase-C-Inhibitoren).

Aufgrund der antineoplastischen Aktivität weisen alle Wirkstoffe erhebliche Nebenwirkungen auf, die sich primär als Hemmung rasch proliferierender Gewebe bemerkbar machen. So ist insbesondere die Erythro-, Leuko- und Thrombopoese gehemmt, sowie das Wachstum der Schleimhautepithelien beeinträchtigt. Als Folge können gastrointestinale Störungen oder irreversible Beeinträchtigungen der Spermatogenese bzw. Anovulation eintreten. Auch die Haut und Hautanhangsgebilde sind regelmäßig betroffen, beispielsweise erleiden viele Patienten einen reversiblen Haarausfall.

In schweren Fällen können die Nebenwirkungen bis hin zu akutem Nierenversagen und toxisch bedingten Organschädigungen an Herz, Lunge, Leber und Nervensystem führen. Schließlich muß als Folge der immunsuppressiven Wirkung mit einer gehäuften Anzahl von Infektionen gerechnet werden.

Die Herstellung und Erforschung von Konjugaten, die einen antineoplastischen Wirkstoff enthalten, war daher auf das Ziel gerichtet, die Verträglichkeit des Wirkstoffes zu verbessern. Für diesen Zweck sind verschiedene antineoplastische Wirkstoffe an Makromoleküle, beispielsweise an Dextran gekoppelt worden (vgl. Kojima et al., J.Pharm.Pharmakol., Vol. 32 (1980), S.30-34; Nakane et al., J.Pharm.Pharmakol., Vol.40 (1988), S.1-6; Nomura et al., J.Controlled Release, Vol.52 (1998), S.239-252; Sato et al., J.Pharm.Sci., Vol.78 (1989), S.11-16). Eine verbesserte Antitumorwirkung der Konjugate konnte in einigen Fällen festgestellt werden.

Alternativ dazu wurden Wirkstoffe, wie Mitomycin C, auch an N-Succinylchitosan (Song et al., J.Controlled Release, Vol.42 (1996), S.93-100), Carboxymethylchitin (Song et al., Arch.Pract.Pharm. Vol.53 (1993), S.141-147) und an Oligopeptide gekoppelt (Soyez et al., J.Controlled Release, Vol.47 (1997), S.71-80). In der Mehrzahl der Analysen wurde wiederum eine ver-

- 16 -

besserte Antitumoraktivität der Konjugate im Vergleich zu dem einzelnen antineoplastischen Wirkstoff beobachtet.

Erfindungsgemäß wurde nunmehr überraschenderweise festgestellt, dass HAS-Wirkstoff-Konjugate, welche einen antineoplastischen Wirkstoff umfassen, eine verbesserte toxische Wirkung gegenüber Tumorzellen und/oder eine verringerte Toxizität für andere Zellen aufweisen. Die Konjugate ermöglichen damit eine größere therapeutische Breite.

10

Die Plasma-Halbwertszeit der Konjugate wird signifikant verlängert. Dies ermöglicht ein Durchbrechen der Reparaturmechanismen in Tumor-Zellen durch längere Exposition. Gleichzeitig ermöglicht die vorliegende Erfindung ein langsames Anfluten, insbesondere in gesundem Gewebe, wodurch eine geringere Peak-Konzentration und eine verbesserte Verträglichkeit für den Patienten erreicht wird.

15

Für die Herstellung der erfindungsgemäßen Konjugate kann ein beliebiger antineoplastischer Wirkstoff verwendet werden. Die antineoplastischen Wirkstoffe können beispielsweise aus den Gruppen bestehend aus Alkylantien, Antimetaboliten, Antibiotika oder Naturstoffen ausgewählt werden.

20

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem antineoplastischen Wirkstoff um Mitomycin C, Cyclophosphamid, Bleomycin, Chlorambucil, Cisplatin, Ara-C, Fludarabin, Doxorubicin, Etoposid, 5-FU, MTX, Vinblastin, Vincristin, Vindesin, Hydroxyurea, 6-MP oder CCNU.

25

30

Die Verwendung von Mitomycin C als Wirkstoff ist besonders bevorzugt. Mitomycin C gehört zur Gruppe der Antibiotika und enthält eine Aziridin- sowie eine Chinon-Gruppe und einen Mito-san-Ring. Der Wirkstoff wird zur Behandlung von Nierenzellkarzinomen, bei Blasentumoren und bei anderen urologischen Erkrankungen eingesetzt. Die Verbindung erlangt ihre Aktivität erst nach Metabolisierung in hypoxischen (also bevorzugt Tumor-)

35

- 17 -

Zellen durch intrazelluläre enzymatische oder spontane chemische Reduktion des Chinons und Verlust der Methoxy-Gruppe. An diese Methoxy-Gruppe kann HAS bevorzugt über einen Linker gekoppelt werden. Nach Abspaltung des Substituenten in der Zelle liegt  
5 intrazellulär der gleiche Wirkstoff vor, der eine alkylierende Vernetzung der DNA bewirkt und dadurch eine toxische Wirkung entfaltet. Alternativ dazu könnte HAS auch an eine der beiden  $\text{NH}_2$ -Gruppen gekoppelt werden. Mitomycin C weist eine typische Gewebe-Spezifität auf. Erfindungsgemäß ist es bevorzugt, dass  
10 diese Spezifität - insbesondere für exkretorische Organe - durch HAS-Kopplung erhöht wird.

Der antineoplastische Wirkstoff kann erfindungsgemäß nach beliebigen Verfahren an HAS gekoppelt werden. Eine spezifische  
15 Kopplung an die reduzierenden Endgruppen der HAS ist jedoch bevorzugt, da durch dieses Vorgehen ein definiertes Konjugat erzeugt wird.

Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung wird Hydroxyethylstärke  
20 an die Methoxy-Gruppe des Mitomycin C gekoppelt. Dabei kann die Kopplung an die Methoxy-Gruppe des Mitomycin C über einen Linker erfolgen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende  
25 Erfindung Verfahren zur Herstellung einer Verbindung, die ein Konjugat aus HAS und einem antineoplastischen Wirkstoff umfaßt. Das Verfahren umfaßt Schritte, bei denen man HAS entweder unmittelbar oder über einen Linker kovalent an einen antineoplastischen Wirkstoff koppelt und das Konjugat isoliert.

30

Ferner betrifft die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen, welche eine Verbindung umfassen, die ein Konjugat aus HAS und einem antineoplastischen Wirkstoff aufweisen. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann ferner einen pharmazeutisch verträglichen  
35 Träger und/oder ein Zytokin umfassen. Das Zytokin ist vorzugsweise IL-2,  $\alpha$ -Interferon,  $\gamma$ -Interferon.

- 18 -

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann in einer beliebigen im Stand der Technik bekannten Applikationsform vorliegen. Beispielsweise kann die Zusammensetzung unter Umständen zur oralen oder parenteralen Verabreichung formuliert sein. Die Formulierung der Zusammensetzung erfolgt nach im Stand der Technik üblichen Verfahren. Neben dem Wirkstoff enthält die Zusammensetzung üblicherweise einen pharmazeutisch verträglichen Träger und einen oder mehrere Hilfsstoffe, sowie gegebenenfalls Konservierungsmittel, Lösungsvermittler, etc.

10

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung einer Verbindung, die ein Konjugat aus HAS und einem antineoplastischen Wirkstoff umfaßt, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumoren und/oder deren Metastasen, insbesondere zur Behandlung von urologischen Tumoren und/oder Metastasen urologischer Tumore, zur Behandlung von Metastasen des Nierenzellkarzinoms, oder zur Behandlung lymphatischer Systemerkrankungen, wie beispielsweise CLL, Hodgkin-Lymphom, NHL, multiples Myelom, Morbus Waldenström. Auch gemäß dieser Ausführungsform der Erfindung kann das Arzneimittel ferner ein Zytokin, beispielsweise IL-2,  $\alpha$ -Interferon,  $\gamma$ -Interferon, umfassen.

20

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von urologischen Tumoren und/oder Metastasen urologischer Tumore, beispielsweise zur Behandlung von Metastasen des Nierenzellkarzinoms ist besonders bevorzugt. Eine kurative Therapie des Nierenzellkarzinoms ist zur Zeit weder mit einer Kombinations-Chemotherapie noch mit Mitomycin C alleine zu erreichen. Dies kann an der ungünstigen Pharmakokinetik der Verbindung liegen, da der Anteil der renalen Elimination nur bei ca. 18% liegt. Da HAS nahezu vollständig über die Nieren eliminiert wird, weist das Konjugat einen höheren Prozentsatz der renalen Elimination im Vergleich zu der nicht-konjugierten Substanz auf. Diese Ausführungsform der vorliegenden Erfindung nutzt die intrazelluläre Zwischenspeicherung der HAS. Insbesondere hoch-substituierte HAS-Sorten (HAS 200/0,62) weisen eine verstärkte intrazelluläre Speicherung, im Extremfall sogar

25

30

35

- 19 -

eine Überladung auf. Dieses Phänomen ist auch im Bereich des proximalen Tubulus beobachtet worden (Peron et al., Clinical Nephrology, Vol. 55 (2001), S.408-411).

- 5 Gemäß dieser Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung somit eine Anreicherung eines antineoplastischen Wirkstoffs in bestimmten Zielzellen oder -geweben zur Verfügung. Die verbesserte Pharmakokinetik der Konjugate ermöglicht es somit bei niedrigeren systemischen Konzentrationen eine wesentlich höhere
- 10 Konzentration in den Zellen des Zielorgans zu erreichen. Diese medizinische Verwendung wird bevorzugt bei dem klarzelligen und dem chromophilen Nierenkarzinom eingesetzt, welche zusammen etwa 90% aller histologischer Typen ausmachen.
- 15 Gemäß einer alternativen Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung lymphatischer Systemerkrankungen, beispielsweise CLL, Hodgkin-Lymphom, NHL, multiples Myelom, Morbus Waldenström. Durch die erfindungsgemäße Kopplung
- 20 von HAS an einen antineoplastischen Wirkstoff wird die intrazelluläre Aufnahme der Wirkstoffe in Abhängigkeit der Kettenlänge und des Substitutionsgrads verlangsamt. Ferner haben radioaktive kinetische Untersuchungen gezeigt, dass HAS in bestimmten Organen, darunter lymphatische Organe, länger als im Gesamtkörper
- 25 gespeichert wird (vgl. Bepperling et al., Crit. Care, Vol.3, Suppl. 1 (1999), S.153). Es erfolgt somit eine Anreicherung der Konjugate in den Zielzellen, was eine verbesserte Pharmakokinetik bei geringerer systemischer Toxizität zur Folge hat.
- 30 Die Behandlung lymphatischer Systemerkrankungen unter Verwendung von Fludarabin als Wirkstoff ist bevorzugt. Fludarabin ist ein halogeniertes Adeninanalog, das gegenüber einer Deaminierung resistent ist.
- 35 Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von kutanen/lokalen primären Malignomen oder deren

- 20 -

Metastasen. Dabei werden zwei Effekte genutzt, die gezielte, gesteigerte Aufnahme durch die genannten Gewebe und der verzögerte Abtransport des HAS-Konjugates aus dem Gewebe. Beides führt zu einer Anreicherung des Konjugates in den Zielzellen.

5

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von hämatologischen Systemerkrankungen oder onkologischen Erkrankungen, beispielsweise von nicht-kleinzelligen und kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Mammakarzinomen, Ösophagus-Plattenepithelkarzinomen, Nierenzellkarzinomen, Hodenkarzinomen, maligne Melanome, ALL oder CML. Insbesondere bei der Verwendung der Konjugate zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms ergeben sich Vorteile aufgrund der starken Anreicherung der Verbindung in dem betroffenen Gewebe durch die größere Hydrophilie des Konjugates und der daraus folgenden stärkeren renalen Elimination. Für diese Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von Vindesin als Wirkstoff besonders bevorzugt.

20 Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels, wobei die Verbindung als Kombinationstherapie mit einem oder mehreren weiteren antineoplastischen Wirkstoffen oder Zytokinen eingesetzt wird. Die Kombinationstherapie kann durch Verabreichung eines Mittels erfolgen, in dem alle Wirkstoffe vorliegen, oder durch Verabreichung von zwei verschiedenen oder mehr Mitteln, in denen jeweils ein Wirkstoff formuliert wurde.

Die vorliegende Erfindung stellt ferner Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verfügung, das ein Zytokin und eine erfindungsgemäße Verbindung enthält und für neue Kombinations-therapien geeignet ist. Entsprechende Mittel sind insbesondere für die Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms geeignet.

35

Gemäß einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Konjugate aus HAS und einem antiarrhythmischen

- 21 -

Wirkstoff bereitgestellt, sowie deren Verwendung zur Behandlung von Herzrhythmusstörungen.

Abweichungen in der zeitlichen Folge und Regelmäßigkeit der  
5 Herzaktionen (Arrhythmien) von der normalen Herzfrequenz werden als Herzrhythmusstörungen bezeichnet. Die Abweichungen sind in der Mehrzahl der Fälle durch Erregungsbildungs- oder Erregungs-  
leitungsstörungen des Herzens bedingt. Als antiarrhythmische  
Wirkstoffe oder Antiarrhythmika werden Substanzen bezeichnet, die  
10 zur Behandlung von Herzrhythmusstörungen, insbesondere bei ventrikulären Herzrhythmusstörungen geeignet sind.

Je nach Art der Wirkung der antiarrhythmischen Wirkstoffe unterscheidet man zwischen Natriumkanal-Blockern (Chinidin, Procainamid,  
15 Disopyramid, etc.), Beta-Rezeptoren-Blockern (Atenolol, Propanolol, etc.), selektiven Repolarisationsverlängerern (Amiodaron, Sotalol, etc.), Calcium-Antagonisten (Verapamil, Gallopamil, etc.) und Lokalanästhetika.

20 Die im Stand der Technik üblichen antiarrhythmischen Wirkstoffe, weisen jedoch teilweise eine kurze Wirkungszeit auf. Adenosin beispielsweise ist ein antiarrhythmischer Wirkstoff mit sehr kurzer Halbwertszeit. Die Wirkdauer dieses Stoffes beträgt nur wenige Minuten. Eine Verlängerung der Halbwertszeit und der  
25 Wirkdauer ist in vielen Fällen notwendig.

Einige antiarrhythmische Wirkstoffe weisen zudem pro-arrhythmogene Nebenwirkungen, teilweise sogar eine erhöhte Mortalität, auf.

30 Die vorliegende Erfindung stellt unter anderem verbesserte antiarrhythmische Wirkstoffe zur Verfügung, die beispielsweise verlängerte Wirkdauer aufweisen. Erfindungsgemäß wurde überraschenderweise festgestellt, dass die HAS-Antiarrhythmika-Konjugate eine signifikant längere in vivo Plasma-Halbwertszeit  
35 aufweisen und die Aktivität der Wirkstoffe durch die Kopplung an HAS nicht wesentlich beeinträchtigt wird.

- 22 -

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung können beliebige antiarrhythmische Wirkstoffe für die Herstellung der Konjugate verwendet werden. Der Wirkstoff kann aus der Gruppe bestehend aus Natriumkanal-Blocker, Beta-Rezeptoren-Blocker, selektive  
5 Repolarisationsverlängerer, Calcium-Antagonisten und Lokalanästhetika ausgewählt werden. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Wirkstoff um Adenosin, Chinidin, Procainamid, Disopyramid, Lidocain, Phenytoin, Mexiletin, Ajmalin, Parjmalium, Propafenon, Atenolol, Propanolol, Amiodaron, Sotalol, Verapamil, Gallopamil  
10 oder Diltiazem, wobei die Verwendung von Adenosin besonders bevorzugt ist.

Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgt die Bindung zwischen dem antiarrhythmischen Wirkstoff und der HAS  
15 über die reduzierenden Endgruppen der HAS.

Bei Verwendung von Adenosin kann dieser Wirkstoff beispielsweise über die Aminogruppe an die HAS gebunden werden, wobei eine Kopplung zwischen der Aminogruppe des Adenosin und der reduzierenden Endgruppe der HAS besonders bevorzugt ist. Bevorzugt ist  
20 eine Kopplungsvariante, bei der nach Metabolisierung (Absprung des HAS) natives Adenosin vorliegt.

Alternativ dazu kann der Wirkstoff über einen sogenannten Linker  
25 an die HAS gekoppelt werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner pharmazeutische Zusammensetzungen, welche eine der erfindungsgemäßen Verbindungen umfaßt. Die pharmazeutische Zusammensetzung umfaßt ferner  
30 üblicherweise einen pharmazeutisch verträglichen Träger und kann beispielsweise für eine intravenöse Applikation formuliert sein.

Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels zur  
35 Behandlung von Herzrhythmusstörungen, insbesondere zur Behandlung ventrikulärer Herzrhythmusstörungen.



- 23 -

Gemäß einer alternativen Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Induktion von Apoptose, beispielsweise in Tumorgeweben oder in inflammatorischen Geweben.

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen, die ein Konjugat aus HAS und einem antiinfektivem Wirkstoff, beziehungsweise einem Antibiotikum umfassen, sowie deren Verwendung zur Behandlung von Infektionserkrankungen.

10

Das Eindringen von Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen) in einen Makroorganismus (Pflanze, Tier, Mensch) und die Vermehrung in diesem wird als Infektion bezeichnet. Entstehung und Verlauf einer Infektionskrankheit hängen im wesentlichen von der Pathogenität des Mikroorganismus und von der Immunität des Makroorganismus ab.

Zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten werden seit Jahrzehnten antiinfektive Wirkstoffe als Chemotherapeutika eingesetzt.

20

Bereits 1928 wurde Penicillin anhand der Eigenschaft des Wirkstoffs, Staphylokokken-freie Zonen auf Kulturschalen zu bilden, von A. Flemings identifiziert. Penicillin war auch das erste Antibiotikum, das im industriellen Maßstab gewonnen werden konnte und große Bedeutung in der klinischen Praxis erlangte.

25

Als Penicilline werden heute Wirkstoffe aus einer Gruppe von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika bezeichnet, die von einem Pilz der Art *Penicilium* (z.B. *P. chrysogenum* und *P. notatum*) gebildet werden. Die bakteriozide Wirkung beruht auf der Blockierung der Synthese der Bakterienzellwand. Das Penicillin inaktiviert das bakterielle Enzym Transpeptidase, wodurch die Quervernetzung der Polysaccharidketten des Mureins der Zellwand verhindert wird.

30

Seit der Entdeckung wurden zahllose Wirkstoffe isoliert und synthetisiert, die das Wachstum von Mikroorganismen hemmen oder diese abtöten. Die meisten Antibiotika stammen von *Streptomyces*-

35

- 24 -

Arten (ca. 65%), die aus dem Boden isoliert wurden. Es wird angenommen, daß die Stoffe vom Mikroorganismus zur Unterdrückung von Konkurrenten im Boden benutzt werden.

- 5 Die Zahl der isolierten Antibiotika wird auf ca. 8000 geschätzt, von denen ca. 100 in der Medizin anwendbar sind. Eine Einteilung der Wirkstoffe in verschiedene Stoffklassen erfolgte nach unterschiedlichen Gesichtspunkten, beispielsweise nach chemischer Struktur oder Wirkungsmechanismus.

10

Inzwischen sind Antibiotika nicht nur für die Bekämpfung von Infektionskrankheiten, sondern auch als Immunodepressiva, Zytostatika in der Antitumorthherapie, Pflanzenschutzmittel, zur Nahrungsmittel-Konservierung, als Masthilfsmittel in der Tier-  
15 fütterung, etc. zugelassen.

In den letzten Jahren traten zahlreiche gegen Antibiotika resistente Stämme von Mikroorganismen auf. Dabei wurden neben einfach-resistenten auch häufiger mehrfach-resistente Stämme gefunden, welche die Bekämpfung bestimmter Krankheiten besonders  
20 erschweren.

Bei der Untersuchung der Aktivität verschiedener Antibiotika gegen bestimmte Erreger wurde festgestellt, daß einige der  
25 Wirkstoffe (beispielsweise Amoxycillin oder Ampicillin) fast ausschließlich extrazellulär wirken (Scaglione et al., Chemotherapie, Vol.39 (1993), 416-423; Balland et al., J.Antimicrob. Chemother., Vol.37 (1996), 105-115). Diese Wirkstoffe lassen sich somit gegen Mikroorganismen, die primär intrazellulär vorliegen,  
30 nicht einsetzen. Zur Verbesserung der intrazellulären Aktivität wurden Ampicillin-Nanopartikel hergestellt (vgl. Balland et al., a.a.O.).

Bei Infektionen wie Tuberkulose oder anderen Mykobakteriosen wäre  
35 eine Erweiterung des Spektrums der Behandlungsmöglichkeiten wegen der immer erforderlichen Kombinationstherapie wünschenswert. Bei anderen interzellulären Infektionen, wie der Chlamydien-Infek-

- 25 -

tion, die in ihrer möglichen Bedeutung für die Pathogenese der Arteriosklerose erst kürzlich erkannt wurde (Stille und Dittmann, Herz, Vol.23 (1998), S.185-192) könnten intrazelluläre, mit Depotwirkung versehene Antibiotika einen wesentlichen Fortschritt  
5 in Therapie und Prophylaxe bedeuten.

Erfindungsgemäß wurde nunmehr überraschenderweise festgestellt, dass die Kopplung antiinfektiver Wirkstoffe an HAS zu einer Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften der Wirk-  
10 stoffe, insbesondere zu einer verlängerten in vivo Halbwertszeit, einer verbesserten intrazellulären Aufnahme und/oder Wirksamkeit des Wirkstoffs führt.

Erfindungsgemäß kann ein beliebiger antiinfektiver Wirkstoff,  
15 bzw. ein beliebiges Antibiotikum verwendet werden. Vorzugsweise wird ein Wirkstoff aus der Gruppe bestehend aus Aminopenicilline, Cephalosporine und Aminocephalosporine, Beta-Laktam-Antibiotika, Carbapeneme, Aminoglycoside, Tetracycline, Makrolid-Antibiotika, Gyrasehemmer, Glycopeptid-Antibiotika, Lincomycine, Streptogrami-  
20 ne, Everninomicine, Oxazolidinone, Nitroimidazole, Sulfonamide, Co-trimoxazol, Lokalantibiotika, Virustatika, Antimycotika, Tuberculostatika ausgewählt.

Dabei kann es sich beispielsweise um Ampicillin, Amoxicillin,  
25 Cefotaxim, Ceftazidim, Vancomycin, Clindamycin, Metronidazol, Isoniazid, Rifampicin, Rifabutin, Rifapentin, Ethambutol, Pyracinamid, Streptomycin, Prothionamid oder Dapson handeln, wobei die Verwendung eines Aminopenicillins, wie Ampicillin, Amoxycillin, Makrolid oder von Streptomycin besonders bevorzugt ist.

30 Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird als Wirkstoff ein Aminopenicillin eingesetzt, das unmittelbar über die Amino-Gruppe des Aminopenicillins kovalent an die Hydroxyethylstärke gekoppelt ist.

35 Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird statt des Aminopenicillin ein Aminocephalosporin eingesetzt, wodurch eine verringerte

- 26 -

Allergenität erreicht wird. Als weitere Ausführungsformen kommen Makrolid-HAS Kopplungen infrage, dabei handelt es sich um Erythromycin oder ein Derivat davon, insbesondere Erythromycylamin. Alternativ dazu kann Streptomycin als Wirkstoff  
5 verwendet werden.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgt die Kopplung zwischen dem antiinfektiven Wirkstoff und der Hydroxyethylstärke über die reduzierenden  
10 Endgruppen der Hydroxyethylstärke.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der antiinfektive Wirkstoff über einen Linker an die Hydroxyethylstärke gekoppelt.  
15

Die vorliegende Erfindung umfaßt ferner pharmazeutische Zusammensetzungen, welche eine erfindungsgemäße Verbindung aufweisen. Üblicherweise enthalten die pharmazeutischen Zusammensetzungen ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger.  
20

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung einer der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer Infektionskrankheit. Die pharmazeutische Zusammensetzung ist in besonderem Maße zur  
25 Behandlung von Infektionserkrankungen geeignet, welche u.a. durch intrazelluläre Erreger verursacht werden. Dabei kann es sich um das gesamte Spektrum pathogener und fakultativ pathogener Erreger, z.B. bakterielle, virale oder parasitäre Erreger, Mykoplasmen, Mycobakterien, Chlamydien, Rickettsien, etc handeln.

30 In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden HAS-Nukleinsäure-Konjugate zur Verfügung gestellt. Derzeit werden Nukleinsäure-Bibliotheken in großem Umfang auf Nukleinsäuren durchsucht, die eine bestimmte Aktivität aufweisen. Eine  
35 entsprechende Aktivität kann beispielsweise die Fähigkeit der Nukleinsäure sein, an bestimmte andere Nukleinsäuren, Rezeptoren oder virale Proteine zu binden. Durch die Bindung kann ein

- 27 -

biologisches Signal stimuliert oder inhibiert werden. Für diesen Zweck werden neben den natürlicherweise vorkommenden D-DNA- und D-RNA-Molekülen auch L-DNA- und L-RNA-Moleküle eingesetzt, die sich von den natürlicherweise vorkommenden Molekülen dadurch unterscheiden, dass sie L-Ribose oder L-Desoxyribose anstelle der entsprechenden D-Form als Bestandteile der Nukleinsäuren aufweisen (vgl. WO 98/08856). Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte gezeigt werden, dass HAS-Nukleinsäure-Konjugate hergestellt werden können, welche die natürliche Funktionalität behalten (vgl. Beispiel 7).

Die vorliegende Erfindung stellt ferner Verfahren zur Herstellung kovalenter HAS-Wirkstoff-Konjugate zur Verfügung. Die Verfahren können in einem wässrigen oder organischen Reaktionsmedium durchgeführt werden, wobei jedoch die Durchführung der Kopplung in der wässrigen Phase bevorzugt ist.

Demgemäß werden Verfahren zur Herstellung eines kovalenten HAS-Wirkstoff-Konjugates zur Verfügung gestellt, bei denen man HAS und mindestens einen Wirkstoff in einem Reaktionsmedium miteinander umsetzt. Das Reaktionsmedium ist dadurch gekennzeichnet, dass es Wasser oder ein Gemisch von Wasser mit organischem Lösungsmittel, welches mindestens 10 Gew.-% Wasser umfaßt, ist.

Das Reaktionsmedium des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt mindestens 10 Gew.-%, bevorzugt mindestens 50 Gew.-%, insbesondere mindestens 80 Gew.-%, wie beispielsweise 90 Gew.-%, oder sogar bis zu 100 Gew.-%, Wasser, und dementsprechend höchstens 90% Gew.-%, bevorzugt höchstens 50 % Gew.-%, insbesondere höchstens 20 Gew.-%, beispielsweise 10 Gew.-%, oder sogar bis zu 0 Gew.-%, organisches Lösungsmittel. Die Reaktion findet also in einer wässrigen Phase statt. Das bevorzugte Reaktionsmedium ist Wasser.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist schon deshalb von Vorteil, weil nicht zwangsläufig toxikologisch bedenkliches Lösungsmittel eingesetzt werden muss und demzufolge bei dem erfindungsgemäß

- 28 -

hergestellten Produkt die Entfernung, auch geringer Reste  
toxikologisch bedenklicher Lösungsmittel entfällt, wie sie nach  
dem bekannten Verfahren immer zwingend ist, um die unerwünschte  
Verunreinigung mit Lösungsmittel zu vermeiden. Weiterhin kann die  
5 nach dem bisherigen Verfahren notwendige zusätzliche Qualitäts-  
kontrolle auf Reste toxikologisch bedenklicher Lösungsmittel  
unterbleiben, weil das erfindungsgemäße Verfahren die Verwendung  
von toxikologisch nicht bedenklichen Lösungsmitteln bevorzugt.  
Erfindungsgemäss bevorzugte Lösungsmittel sind beispielsweise  
10 toxikologisch unbedenkliche protische Lösungsmittel wie Ethanol  
oder Propylenglykol.

Weiterhin ist ein Vorteil des erfindungsgemässen Verfahrens, dass  
durch organische Lösungsmittel induzierte irreversible oder  
15 reversible Strukturänderungen von Proteinen oder Peptiden  
grundsätzlich vermieden werden, die bei Verfahren in organischen  
Lösungsmitteln nicht systematisch ausgeschlossen werden können.  
Die nach den erfindungsgemässen Verfahren erhaltenen Polypeptide  
können demzufolge von den in DMSO hergestellten verschieden sein.

20 Erfindungsgemäß wurde ferner überraschenderweise festgestellt,  
dass eine Kopplung von HAS an Wirkstoffe in einer wässrigen  
Lösung vorgenommen werden kann, ohne dass dabei in nennenswertem  
Umfang Nebenreaktionen zu beobachten sind. Das erfindungsgemäße  
25 Verfahren führt somit unmittelbar zu verbesserten Produkten in  
großer Reinheit. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht somit  
erstmal die einfache Herstellung von HAS-Wirkstoff-Konjugaten,  
in denen der Wirkstoff in aktiver Form vorliegt und die vor-  
teilhaften Eigenschaften der HAS erhalten bleiben. Zur Isolierung  
30 des HAS-Wirkstoff-Konjugates aus dem Reaktionsgemisch sind keine  
besonderen Verfahren erforderlich, da die Reaktion in der  
wässrigen Phase erfolgt, also nicht zwangsläufig organische  
Lösungsmittel abgereinigt werden müssen.

35 Erfindungsgemäß ist es bevorzugt, dass HAS unmittelbar an eine  
 $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe,  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe, SH-Gruppe, COOH-Gruppe oder -C(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-  
Gruppe des Wirkstoffes bindet. Alternativ dazu kann eine weitere

- 29 -

reaktive Gruppe in HAS eingeführt werden oder die Bindung zwischen HAS und dem Wirkstoff über einen Linker erfolgen. Die Verwendung von entsprechenden Linkern zur Bindung von Wirkstoffen an PEG ist im Stand der Technik bekannt. Die Verwendung von

5 Aminosäuren, insbesondere Glycin, Alanin, Leucin, Isoleucin, und Phenylalanin, sowie von Hydrazin- und Oxylamin-Derivaten als Linker, wie in WO 97/38727 und EP 605 963 offenbart, ist bevorzugt.

- 10 Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens der vorliegenden Erfindung wird HAS vor Bindung an den Wirkstoff oxidiert. Die Oxidation kann nach einem der im Stand der Technik bekannten Verfahren erfolgen, wobei eine selektive Oxidation der reduzierenden Endgruppen der HAS bevorzugt ist. Dieses Vorgehen ermöglicht
- 15 Verfahren, bei denen die oxidierte reduzierende Endgruppe der HAS mit einer Aminogruppe des Wirkstoffes unter Ausbildung eines Amids reagiert. Diese Ausführungsform weist den besonderen Vorteil auf, dass eine spezifische Bindung zwischen HAS und den Wirkstoffen und somit ein besonders homogenes Produkt erzielt
- 20 wird.

- Dabei läßt man HAS mit oxidierten reduzierenden Endgruppen und den Wirkstoff vorzugsweise mindestens 12, besonders bevorzugt mindestens 24 Stunden miteinander reagieren. Ferner kann es
- 25 wünschenswert sein, einen beliebigen Aktivator, beispielsweise Ethyldimethyl-aminopropyl-Carbodiimid (EDC), zuzugeben. Das Mol-Verhältnis zwischen HAS und Wirkstoff während der Reaktion kann beliebig gewählt werden, liegt üblicherweise im Bereich von HAS:Wirkstoff von 20:1 bis 1:20, wobei ein Verhältnis von 6:1 bis
- 30 1:6 besonders bevorzugt ist. Die besten Ergebnisse wurden bei einem Mol-Verhältnis von HAS:Wirkstoff von etwa 2:1 erzielt.

- Andere Kopplungsreaktionen zwischen einer Aminogruppe des Wirkstoffes und HAS sind selbstverständlich auch vom Umfang der
- 35 Erfindung umfaßt. Beispielsweise Verfahren, bei denen HAS und der Wirkstoff unmittelbar miteinander umgesetzt werden, wobei eine Schiff'sche Base zwischen HAS und Wirkstoff als Zwischenprodukt

- 30 -

entsteht. Die Azomethingruppe  $-\text{CH}=\text{N}-$  der Schiff'schen Base kann anschließend unter formaler Addition von  $\langle 2\text{H} \rangle$  zu einer Methylen-amingruppe  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$  reduziert werden. Für diese Reduktion kann der Fachmann eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten  
5 Reduktionsmitteln verwenden, wobei die Reduktion mittels  $\text{BH}_3$  besonders bevorzugt ist.

Die Kopplung des HAS kann an eine beliebige Gruppe des Wirkstoffes erfolgen. Die Kopplung wird vorzugsweise so vorgenommen,  
10 dass das metabolisierte Konjugat mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 75% der Aktivität des Wirkstoffes vor der Kopplung aufweist, wobei ein Erhalt von mindestens 95% der Aktivität besonders bevorzugt ist. Die Kopplungsreaktion kann natürlich  
15 auch so gesteuert werden, dass die Bindung des HAS ausschließlich an eine oder mehrere bestimmte Gruppen des Wirkstoffes erfolgt, beispielsweise an Lysin- oder oder Cystein-Reste eines Peptids. Besondere Vorteile ergeben sich, wenn man HAS über die oxidierten  
reduzierenden Endgruppen an eine oder mehrere bestimmte Gruppen des Wirkstoffes bindet, da bei einem entsprechenden Vorgehen  
20 homogene HAS-Wirkstoff-Konjugate erhalten werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens der vorliegenden Erfindung werden als Ausgangsstoffe für die Reaktion HAS und ein Protein oder ein Peptid eingesetzt. Dabei können  
25 beliebige therapeutische oder diagnostische Proteine natürlichen oder rekombinanten Ursprungs verwendet werden. Eine Liste der derzeit auf dem Markt befindlichen Wirkstoffe rekombinanter Herstellung findet sich in Pharma Business, July/August 2000, Seiten 45 bis 60. Die vorliegende Erfindung umfaßt die Her-  
30 stellung von HAS-Wirkstoff-Konjugaten, die irgend einen der in dieser Veröffentlichung genannten Wirkstoffe umfassen.

Die Herstellung von Konjugaten unter Verwendung von Zytokinen, beispielsweise Interferonen, Interleukinen, Wachstumsfaktoren,  
35 Enzymen, Enzym-Inhibitoren, Rezeptoren, Rezeptor-Fragmenten, Insulin, Faktor VIII, Faktor IX, Antibiotika (oder Antiinfektiva), Peptid-Antibiotika, viralen Hüll-Proteinen, Hämoglobinen,



- 31 -

Erythropoietin, Albuminen, hTPA, Antikörpern, Antikörperfragmenten, Einzelketten-Antikörpern, DNA, RNA oder ein Derivat derselben ist besonders bevorzugt. Besondere Vorteile ergeben sich bei der Verwendung von rekombinanten Proteinen oder Peptiden  
5 in dem erfindungsgemäßen Verfahren. Wie bereits ausgeführt, können entsprechende Proteine häufig aufgrund ihrer für Menschen antigenen Eigenschaften nicht als Wirkstoffe eingesetzt werden. Nach Kopplung an HAS durch die erfindungsgemäßen Verfahren verringert sich jedoch die Immunogenität der rekombinanten  
10 Proteine, was den medizinische Einsatz am Menschen ermöglicht.

Besondere Vorteile ergeben sich ferner bei der Kopplung von HAS an kurzkettige Proteine und kleinere Peptide. Derzeit werden eine Vielzahl von Peptidbanken erstellt, beispielsweise Phagen-  
15 Display-Banken, bei denen kurze Oligopeptide (beispielsweise 3- bis 20-mere) auf der Oberfläche von Phagen exprimiert werden. Ferner werden Antikörper aus einer einzigen Polypeptidkette (sogenannte "single chain antibodies", Einzelketten-Antikörper) in Bakterien oder auf der Oberfläche von Phagen exprimiert. Diese  
20 Banken werden auf bestimmte Wirkstoff- oder Bindungs-Aktivität hin durchgesehen. Die therapeutische und diagnostische Verwendung entsprechender Peptid-Wirkstoffe oder Antikörper scheitert jedoch bislang daran, dass diese im Organismus aufgrund ihrer geringen Größe sehr schnell ausgeschieden werden (vgl. Chapman et al.,  
25 1999, a.a.O.). Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren können diese Peptide vorteilhaft an HAS gekoppelt werden, und weisen eine in vivo Halbwertszeit auf, die eine Verwendung als Wirkstoff ermöglicht.

Alternativ zu den obigen Ausführungsformen kann als Wirkstoff ein  
30 Hormon, ein Steroidhormon, ein von Aminosäuren abgeleitetes Hormon oder ein von Fettsäuren abgeleitetes Hormon eingesetzt werden. Im Einzelfall mag es notwendig sein, eine aktive Gruppe, beispielsweise mittels Linker, in das Hormon vor der Bindung an  
35 HAS einzuführen.

- 32 -

Erfindungsgemäß kann beliebige physiologisch verträgliche HES als Ausgangsmaterial verwendet werden. HES mit einem mittleren Molekulargewicht (Gewichtsmittel) von 1 bis 300 kDa, insbesondere von 1 bis 150 kDa ist bevorzugt. HES mit einem mittleren Molekulargewicht von 2 bis 40 kD ist besonders bevorzugt. HES weist vorzugsweise einen molaren Substitutionsgrad von 0,1 bis 0,8 und ein Verhältnis von C<sub>2</sub> : C<sub>6</sub>-Substitution im Bereich von 2 bis 20, jeweils bezogen auf die Hydroxyethylgruppen, auf.

- 10 Die Erfindung betrifft ferner die nach den obigen Verfahren erhältlichen HAS-Wirkstoff-Konjugate. Diese Konjugate weisen vorteilhafte Eigenschaften auf, nämlich hohe Aktivität des Wirkstoffs, geringe Immunogenität, lange Verweilzeit im Körper und exzellente rheologische Eigenschaften, welche den medizini-
- 15 schen Nutzen der Konjugate steigern.

Demgemäß umfaßt die vorliegende Erfindung ebenfalls Verfahren zur Herstellung eines Arznei- oder Diagnosemittels, bei denen man ein HAS-Wirkstoff-Konjugat nach einem der obigen Verfahren herstellt

20 und mit einem der im Stand der Technik bekannten, pharmazeutisch verträglichen Träger, Adjuvans oder Hilfsstoff vermischt, sowie nach diesem Verfahren erhältliche Arznei- oder Diagnosemittel.

Die medizinische Verwendung des entsprechenden Arzneimittels

25 hängt von der Art des Wirkstoffs ab. Wird beispielsweise Hämoglobin als Wirkstoff eingesetzt, kann das Konjugat als Sauerstoff-Transport-Mittel verwendet werden. Wird andererseits ein Zytokin als Wirkstoff für die Herstellung verwendet, kann das Konjugat beispielsweise in der Tumorthherapie verwendet werden.

30 Die Konzentration des jeweils zu verwendenden Konjugates in dem Arzneimittel kann von jedem durchschnittlichen Fachmann ohne weiteres in Dosis-Wirkungstests ermittelt werden.

Die Diagnosemittel können in vivo oder in vitro zur Diagnose von

35 Erkrankungen oder Störungen verwendet werden. Wenn als Wirkstoff ein Antikörper oder Antikörperfragment eingesetzt wird, eignet

- 33 -

sich das Konjugat beispielsweise für die Durchführung der im Stand der Technik üblichen ELISA-Nachweisverfahren.

In den Beispielen wurden die nachfolgend beschriebenen Materialien verwendet:

Humanes Serumalbumin: Sigma-Aldrich A3782

10 HES 130kD: Typ 130/0,5, hergestellt aus T91SEP  
(Fresenius Kabi)  
Daten:  $M_w$ : 130 000  $\pm$  20 000D  
 $M_n$ : 42 600 D

15 HES 10 kD: Typ HHH 4-2 (Fresenius Kabi)  
Daten:  $M_w$ : 9 800 D  
 $M_n$ : 3 695 D

20 EDC: Sigma-Aldrich Nr. 16.146-2  
(Ethyldimethyl-aminopropyl-Carbodiimid)

HOBT Sigma-Aldrich Nr. 15.726-0  
(1-Hydroxy-1H-Benzotriazolhydrat)

25 DIG-Glykandetektionskit: Roche-Boehringer Nr. 1142 372

Die folgenden Beispiele 1 bis 6 beschreiben die Kopplung von HSA und Diaminobutan an HES mit oxidierten reduzierenden Endgruppen oder die direkte Kopplung von HSA an HES. HSA und Diaminobutan sind dabei lediglich Beispiele für die oben definierten Wirkstoffe. Beispiel 7 beschreibt die Kopplung von Oligonukleotiden an HES.

35 Beispiel 1: Selektive Oxidierung der reduzierenden Endgruppen der Hydroxyethylstärke:

Für die selektive Oxidierung der reduzierenden Endgruppen der Hydroxyethylstärke (130 kD und 10 kD) wurde diese in einer minimalen Menge Wasser aufgelöst und mit einer verschiedenen Menge einer Iod-Lösung und einer KOH-Lösung versetzt.

Die Mischung wurde gerührt, bis die auf  $I_2$  hinweisende Farbe verschwand. Diese Vorgehensweise wurde mehrfach wiederholt, um

die Zugabe einer größeren Menge der Iod-Lösung und KOH-Lösung zu erreichen. Die Lösung wurde anschließend über einen Amberlite IR 120 Na<sup>+</sup> Kationenaustauscherharz gereinigt, für 20 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert (Dialyseröhrchen mit einer Ausschlussgrenze von 4-6 kD) und lyophilisiert.

Der Grad der Oxidation wurde jeweils mittels des in Somogyi, N. (Method in Carbohydride Chemistry, Vol. 1, (1962) S. 384-386) offenbarten Verfahrens ermittelt. Die Protokolle der Oxidationsreaktion sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Verfahren	HES (Mn)	Iod-Lösg. 0.1N	KOH-Lösg. 0.1N	Lösungs- mittel	Reaktionszeit	Ertrag
15 OXIDATION (1) HES 130	1 g $2.4 \times 10^{-5}$ mol	0.3 ml $3.0 \times 10^{-5}$ mol	0.5 ml $5.0 \times 10^{-5}$ mol	Wasser 4.0 ml	4 h 25°C	30.1%
OXIDATION (2) HES 130	4 g $9.4 \times 10^{-6}$ mol	1.0 ml $1.0 \times 10^{-4}$ mol	1.5 ml $1.5 \times 10^{-4}$ mol	Wasser 6.0 ml	0. Nacht 25°C	24.8%
20 OXIDATION (3) HES 130	5 g $1.2 \times 10^{-4}$ mol	1.2 ml $1.2 \times 10^{-4}$ mol	1.5 ml $1.5 \times 10^{-4}$ mol	Wasser 7.5 ml	0. Nacht 25°C	24.3%
OXIDATION (4) HES 130	5 g $1.2 \times 10^{-4}$ mol	3.0 ml $3.0 \times 10^{-4}$ mol	4.5 ml $4.5 \times 10^{-4}$ mol	Wasser 7.5 ml	0. Nacht 25°C	60.8%
OXIDATION (5) HES 130	5 g $1.2 \times 10^{-4}$ mol	4.0 ml $4.0 \times 10^{-4}$ mol	5 ml $5.0 \times 10^{-4}$ mol	Wasser 7.5 ml	0. Nacht 25°C	80.0%
25 OXIDATION (6) HES 130	8 g $1.9 \times 10^{-4}$ mol	7.0 ml $7.0 \times 10^{-4}$ mol	11.5 ml $1.2 \times 10^{-3}$ mol	Wasser 7.5 ml	0. Nacht 25°C	88.4%
OXIDATION (7) HES 130	10 g $2.4 \times 10^{-4}$ mol	10 ml $1.0 \times 10^{-3}$ mol	20 ml $2.0 \times 10^{-3}$ mol	Wasser 7.5 ml	0. Nacht 25°C	100%
30 OXIDATION (1) HES 10	5 g $1.4 \times 10^{-3}$ mol	2.0 ml $2.0 \times 10^{-4}$ mol	2.0 ml $2.0 \times 10^{-4}$ mol	Wasser 10.0 ml	20 h 25°C	3.0%
OXIDATION (2) HES 10	5 g $1.4 \times 10^{-3}$ mol	3.5 ml $3.5 \times 10^{-4}$ mol	4.5 ml $4.5 \times 10^{-4}$ mol	Wasser 10.0 ml	0. Nacht 25°C	5.3%
OXIDATION (3) HES 10	15 g $4.1 \times 10^{-3}$ mol	21.0 ml $2.1 \times 10^{-3}$ mol	31.0 ml $3.1 \times 10^{-3}$ mol	Wasser	0. Nacht 25°C	10.5%
35 OXIDATION (4) HES 10	8 g $2.2 \times 10^{-3}$ mol	83.0 ml $8.3 \times 10^{-3}$ mol	180.0 ml $1.8 \times 10^{-2}$ mol	Wasser	0. Nacht 25°C	80.0%
OXIDATION (5) HES 10	7 g $1.9 \times 10^{-3}$ mol	95.0 ml $9.5 \times 10^{-3}$ mol	210.0 ml $2.1 \times 10^{-2}$ mol	Wasser	0. Nacht 25°C	100.0%
40 OXIDATION (6) HES 10	6.4 g $1.7 \times 10^{-3}$ mol	50 ml $5.0 \times 10^{-3}$	150 ml $1.5 \times 10^{-2}$	Wasser	0. Nacht 25°C	100.0%

- 35 -

Tabelle 1: Oxidation der reduzierenden Endgruppen der HES  
(130 kD und 10 kD) unter verschiedenen Bedingungen

Die in dieser Tabelle zusammengefaßten Protokolle werden nach-  
folgend für die Oxidation (6), HES 10 kD, im Detail wiederge-  
geben: 6.4 g HES 10kD (1.7 mmol) wurden in einem Reaktionsgefäß  
unter ständigem Rühren in wenigen ml Wasser gelöst. Dazu wurden  
50 ml einer 0.1 N Jodlösung (5.0 mmol) und 150 ml einer 0.1 N  
KOH-Lösung (15 mmol) gegeben. Diese Mischung wurde über Nacht bei  
25°C stehen gelassen. Der Mix wurde mit Amberlite IR 120 (Na+-  
Form) gereinigt und gegen Wasser dialysiert (Dialyseschlauch  
Celluloseacetat; Cut-off 4 bis 6 kD). Das dialysierte Produkt  
wurde lyophilisiert (Heraeus-Christ Alpha, Kolbentrocknung über  
Nacht).

Wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, wurde eine vollständige Oxidation  
der reduzierenden Endgruppen (entspricht Ertrag 100%) der HES 130  
kD erzielt, nachdem die Iod-Menge von  $3,0 \times 10^{-5}$  mol bis auf  
 $1,0 \times 10^{-3}$  mol erhöht wurde.

Für eine vollständige Oxidation der reduzierenden Endgruppen der  
HES 10 kD war eine weitere Steigerung der Iod-Menge auf eine  
Konzentration von mehr als  $2,1 \times 10^{-3}$  mol notwendig.

Beispiel 2: Bindung von HES mit oxidierten reduzierenden End-  
gruppen an HSA in wässriger Phase:

Für die Kopplung wurde Hydroxyethylstärke mit oxidierten reduzie-  
renden Endgruppen (ox-HES) und HSA vollständig in Wasser gelöst.  
Als die Lösung klar war, wurde Ethyldimethyl-aminopropyl-  
Carbodiimid (EDC) in Wasser gelöst zugegeben. Nach Aktivierung  
durch EDC bei gemäßigttem Rühren wurden weitere Mengen an EDC  
zugegeben. Die Reaktion wurde gegebenenfalls mit HOBT aktiviert  
und über Nacht stehengelassen. Das Produkt wurde durch Dialyse  
gegen destilliertes Wasser für 15 Stunden gereinigt und an-  
schließend lyophilisiert (nachfolgend als Verfahren A bezeichnet).

Die Protokolle der Kopplungsreaktion finden sich in Tabelle 2.

	Verfahren A	HSA	ox-HES (Mn)	EDC	HOBt	Lösungs- mittel	Akti- vier.	Reaktion
5	Kopplung I ox-HES 130	300 mg $4.4 \times 10^{-6}$ mol	100 mg (1) $2.4 \times 10^{-6}$ mol	25 mg $1.6 \times 10^{-4}$ mol	100 mg $7.7 \times 10^{-4}$ mol	H <sub>2</sub> O/Dioxan 13 ml/2 ml	1.5 h 3-4°C	4 h 25°C
	Kopplung II ox-HES 130	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	300 mg (2) $7.0 \times 10^{-6}$ mol	15 mg $9.7 \times 10^{-6}$ mol	100 mg $7.7 \times 10^{-4}$ mol	H <sub>2</sub> O/Dioxan 10 ml/3 ml	1.5 h 3-4°C	0. Nacht 25°C
	Kopplung III ox-HES 130	200 mg $3.0 \times 10^{-6}$ mol	3.8 g (5) $8.9 \times 10^{-6}$ mol	46.5 mg $3.0 \times 10^{-4}$ mol	20 mg $1.5 \times 10^{-4}$ mol	H <sub>2</sub> O/Dioxan 10 ml/3 ml	0 h	24 h 25°C
10	Kopplung IV ox-HES 130	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	1.9 g (5) $4.5 \times 10^{-6}$ mol	25 mg $1.6 \times 10^{-4}$ mol	20 mg $1.5 \times 10^{-4}$ mol	Wasser	1.5 h 3-4°C	0. Nacht 25°C
	Kopplung V ox-HES 130	200 mg $3.0 \times 10^{-6}$ mol	4.3 g (5) $1.0 \times 10^{-5}$ mol	100 mg $6.0 \times 10^{-4}$ mol	0 mg	Wasser	0 h	0. Nacht 25°C
15	Kopplung VI ox-HES 130	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	130 mg (7) $3.0 \times 10^{-6}$ mol	50 mg $3.0 \times 10^{-4}$ mol	0 mg	Wasser 5ml + 10ml	0 h	5 h 25°C
	Kopplung VII ox-HES 10	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	130 mg (7) $3.0 \times 10^{-6}$ mol	200 mg $3.0 \times 10^{-4}$ mol	0 mg	Wasser 5ml + 2x 10ml	0 h	24 h 25°C
	Kopplung I ox-HES 10	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	300 mg (1) $8.1 \times 10^{-6}$ mol	5 mg $3.0 \times 10^{-5}$ mol	100 mg $7.7 \times 10^{-4}$ mol	H <sub>2</sub> O/Dioxan 13 ml/2 ml	1.5 h 3-4°C	0. Nacht 25°C
20	Kopplung II ox-HES 10	70 mg $1.0 \times 10^{-6}$ mol	1.0 g (2) $2.7 \times 10^{-6}$ mol	15.5 mg $1.0 \times 10^{-4}$ mol	0 mg	Wasser	10 ml 0 h	0. Nacht 25°C
	Kopplung III ox-HES 10	200 mg $3.0 \times 10^{-6}$ mol	3.0 g (3) $8.1 \times 10^{-6}$ mol	77.5 mg $5.0 \times 10^{-4}$ mol	20 mg $1.5 \times 10^{-4}$ mol	Wasser	0 h	6 h 25°C
25	Kopplung IV ox-HES 10	50 mg $7.4 \times 10^{-7}$ mol	7.4 g (4) $2.0 \times 10^{-5}$ mol	282 mg $1.5 \times 10^{-3}$ mol	0 mg	Wasser	0 h	0. Nacht 25°C
	Kopplung V ox-HES 10	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	103 g (6) $2.8 \times 10^{-6}$ mol	93 mg $5.6 \times 10^{-4}$ mol	0 mg	Wasser 4 ml	0 h	20 h 25°C
30	Kopplung VI ox-HES 10	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	103 g (6) $2.8 \times 10^{-6}$ mol	200 mg $1.2 \times 10^{-3}$ mol	0 mg	Wasser 3x5 ml	0 h	30 h 25 °C

- Zugabe der EDC-Lösung mit einem Tropftrichter innerhalb von 60 Min.

Tabelle 2: Kopplungsreaktionen zwischen HES (130 kD und 10 kD) mit oxidierten reduzierenden Endgruppen und HSA unter verschiedenen Bedingungen (Verfahren A; Zahl in der Klammer in Spalte HES gibt das Oxidationsverfahren nach Tabelle 1 wieder)

Die Kopplungsreaktion VII zwischen ox-HES 130 kD und HSA wird im folgenden im Detail erläutert: In einem Rundkolben wurden 130 mg ox-HES 130 kD (Oxidationsgrad ca. 100%) und 100 mg HSA unter Rühren in ca. 5 ml Wasser bei Raumtemperatur gelöst. Sobald die Lösung klar war, wurden 200 mg EDC in 3 Portionen jeweils in 5-10

- 37 -

ml Wasser gelöst über einen Zeitraum von einer Stunde zugetropft. Zwischen jeder Zugabe ließ man ca. 4 h bei Raumtemperatur rühren. Nach 24 h Reaktionszeit wurde das Gemisch gegen Wasser dialysiert (Dialyseschlauch Celluloseacetat; Cutoff 4-6 kD). Anschließend wurde das Produkt lyophilisiert.

Beispiel 3: Direkte Bindung von HES an HSA in wässriger Phase:

Das Prinzip dieser Reaktion basiert auf der Bildung von Schiff'schen Basen zwischen HES und Aminogruppen des Proteins, wobei die Reaktion durch die Reaktion der Schiff'schen Base zu dem entsprechenden Amin mittels  $\text{NaBH}_4$  gesteuert wird (nachfolgend als Verfahren B bezeichnet).

Dafür wurde HES vollständig in wenig Wasser gelöst. Dazu wurde in Boratpuffer, pH 9.0, gelöstes HSA gegeben. Zu dieser Lösung wurde  $\text{NaBH}_4$  gegeben und bei Raumtemperatur unter Rühren belassen. Ein weiteres Aliquot von HES 130 kD, gefolgt von weiterem  $\text{NaBH}_4$  wurden zugegeben. Nach Abschluß der Reaktion wurde wie beschrieben dialysiert und gefriergetrocknet.

Die Protokolle der einzelnen Versuche sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Verfahren B	HSA	HES (Mn)	$\text{NaBH}_4$	Puffer pH	Reaktionszeit
Kopplung I HES 130	50 mg $7.5 \times 10^{-7} \text{ mol}$	500 mg $1.2 \times 10^{-5} \text{ mol}$	500 mg $1.3 \times 10^{-2} \text{ mol}$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0 ml 7.4	48 h 25°C
Kopplung II HES 130	100 mg $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol}$	1.0 g $2.4 \times 10^{-5} \text{ mol}$	60 mg $1.6 \times 10^{-3} \text{ mol}$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 ml 7.4	20 h 25°C
Kopplung III HES 130	50 mg $7.5 \times 10^{-7} \text{ mol}$	9.8 g $2.3 \times 10^{-4} \text{ mol}$	285 mg $7.5 \times 10^{-3} \text{ mol}$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 ml 7.4	36 h 25°C
Kopplung IV HES 130	50 mg $7.5 \times 10^{-7} \text{ mol}$	2.0 g $4.7 \times 10^{-5} \text{ mol}$	180 mg $4.7 \times 10^{-3} \text{ mol}$	Borat 0.1M 9.0	30 h 25°C
Kopplung V HES 130	50 mg $7.5 \times 10^{-7} \text{ mol}$	4.0 g $9.4 \times 10^{-5} \text{ mol}$	60 mg $1.6 \times 10^{-3} \text{ mol}$	Borat 0.1M 9.0	100 h 25 °C
Kopplung I HES 10	50 mg $7.5 \times 10^{-7} \text{ mol}$	2.8 g $9.4 \times 10^{-5} \text{ mol}$	28 mg $1.6 \times 10^{-3} \text{ mol}$	Borat 0.1M 9.0	80 h 25°C

Tabelle 3: Direkte Kopplung zwischen HES (130 kD und 10 kD) und HSA unter verschiedenen Bedingungen (Verfahren B)

5 Im Einzelnen wurden für die Kopplung der HES 130 kD 2.0 g dieser Verbindung vollständig in Wasser gelöst (ca. 5 ml). Dazu wurden 50 mg in 1 ml 0.1 M Boratpuffer, pH 9,0, gelöstes HSA gegeben. Zu dieser Lösung wurden 30 mg  $\text{NaBH}_4$  gegeben und unter Rühren bei Raumtemperatur belassen. Nach 18 h wurde ein weiteres Aliquot von  
10 2.0 g HES 130 kD, gefolgt von weiteren 30 mg  $\text{NaBH}_4$  zugegeben. Nach insgesamt 100 h Reaktionszeit wurde dialysiert und gefriergetrocknet (Kopplung V, HES 130 kD).

Für die Kopplung der HES 10 kD wurden 1.4 g dieser Verbindung  
15 komplett in Wasser gelöst (ca. 5 ml). Dazu wurden 50 mg in 1 ml 0,1 M Boratpuffer, pH 9,0, gelöstes HSA gegeben. Zu dieser Lösung wurden 14 mg  $\text{NaBH}_4$  gegeben und unter Rühren bei Raumtemperatur belassen. Nach 18 h wurde ein weiteres Aliquot von 1.4 g HES 10 kD, gefolgt von weiteren 14 mg  $\text{NaBH}_4$  zugegeben. Nach insgesamt 80  
20 h Reaktionszeit wurde dialysiert und gefriergetrocknet (Kopplung I, HES 10 kD).

Beispiel 4 Analyse der Kopplungsprodukte mittels GPC:

25

Die Reaktionsprodukte wurden zunächst unter Verwendung von Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) analysiert.

4.1 Für die GPC wurde ein FPLC-Gerät (Pharmacia), welches mit  
30 einem HPLC UV Monitor (Hitachi) verbunden war, verwendet. Ferner wurden die folgenden Bedingungen verwendet:

35 Säule: Superose 12 HR 10/30 (1x30 cm) (Pharmacia)  
UV-Monitor: 280 nm  
Pumpe: 0,2 ml/min  
Puffer: 50 mM Phosphat/150 mM NaCl pH 7,2.

Unter diesen Bedingungen wird der HSA-Peak üblicherweise nach 63 min gefunden, wobei zusätzlich ein kleiner Peak bei



- 39 -

etwa 57 min gemessen werden kann, der durch HSA-Dimere verursacht wird. Die mittels GPC erhaltenen Chromatogramme lassen sich wie folgt analysieren:

5 4.2 Fig. 1 ist ein Chromatogramm, das die Größenverteilung der  
Produkte nach Kopplung von ox-HES 130 kD an HSA (Kopplung  
III) zeigt. Bei diesem Kopplungsverfahren wurden ohne HOBt-  
Aktivierung sehr gute Ergebnisse erzielt. Ein deutlicher,  
10 einzelner breiter Peak wurde bei 37 Min. und eine weitere,  
kleinere Bande bei 45 Min. gemessen, was auf ein Kopplungs-  
produkt mit höherem Molekulargewicht als HSA hinweist.  
Gleichzeitig wurden Spuren von nicht-modifiziertem HSA  
gefunden.

15 Fig. 2 zeigt die Größenverteilung der Produkte nach Kopplung  
von ox-HES 130 kD an HSA (Kopplung IV). Die Reaktion wurde  
mit HOBt aktiviert. Es zeigt sich, dass diese Aktivierung  
die Ausbeute verringert, möglicherweise durch Förderung von  
Nebenreaktionen.

20 Die Fig. 3 und 4 zeigen die Größenverteilung der Reak-  
tionsprodukte während und nach der Kopplungsreaktion von ox-  
HES 130 kD an HSA (Kopplung V). Nach 2 Stunden Reaktionszeit  
wurde nicht-modifiziertes HSA als Produkt mit der höchsten  
25 Konzentration, daneben aber auch erste Kopplungsprodukte mit  
höherem Molekulargewicht gefunden. Nach Ablauf der Reaktion  
wurde ein homogenes Kopplungsprodukt mit einer Retentions-  
zeit von ca. 35 Min. in hoher Konzentration gefunden. Nicht-  
modifiziertes HSA und andere Kopplungsprodukte lagen in  
30 relativ geringer Konzentration vor.

Fig. 5 zeigt die entsprechende Größenverteilung der Reak-  
tionsprodukte während und nach der Kopplungsreaktion von ox-  
HES 10 kD an HSA (Kopplung V). Auch hier zeigt sich, dass  
35 die Konzentration der Kopplungsprodukte mit einem Molekular-  
gewicht, das oberhalb des Gewichtes von HSA liegt, im  
Verlauf der Reaktion zunimmt.

Eine Kopplungsreaktion, bei der nahezu alle HSA-Moleküle in ein homogenes Kopplungsprodukt überführt werden konnten, wird schließlich in Fig. 6 gezeigt (Reaktionsprodukte der Kopplung VII).

5

- 4.2 Ein Beispiel für die Chromatogramme, die bei der Analyse der direkten Kopplung von HES an HSA erhalten wurden, wird in Fig. 7 gezeigt (Verfahren B, HES 130 kD, Kopplung V). Ein deutlicher Peak bei ca. 65 Min. (HSA) ist zu erkennen. Darüber hinaus wurde aber auch ein Kopplungsprodukt nachgewiesen (Peak bei ca. 42 Min.).

10

Beispiel 5 Analyse der Kopplungsprodukte mittels SDS-PAGE und Western Blot:

15

- 5.1 PAGE wurde in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) unter Verwendung eines Miniprotean II Gerätes der Firma Biorad und 7,5 % Acrylamidgele durchgeführt. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers. Die Gele wurden nach dem Verfahren von Blum (Elektrophoresis, Vol. 8, (1997) S. 93-99) mit Silber gefärbt, um Proteine sichtbar zu machen.

20

- Die Gegenwart von Glykanen in den Kopplungsprodukten wurde mittels Western-Blot und Glykan-Detektions-Kit der Firma Roche-Boehringer nachgewiesen. Nach Auftrennung der Produkte mittels SDS-PAGE wurden diese unter Verwendung des Blotting-Gerätes der Miniprotean II Elektrophoreseeinheit auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Die Membran wurde anschließend mittels Periodat unter Bedingungen oxidiert, bei denen lediglich die vicinalen OH-Gruppe oxidiert werden. Diese wurden anschließend mit einem Amino-funktionalisierten Digoxigenin umgesetzt. Gebundenes Digoxigenin wurde mittels spezifischer monoklonaler Antikörper, welche an eine alkaline Phosphatase gebunden waren, nachgewiesen. Dafür wurde ein Substrat der Phosphatase (4-Nitro-tetrazolium-

30

35

chlorid/5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) zugegeben, welches ein schwerlösliches blau-violettes Produkt erzeugt. Dieses Produkt schlägt sich auf der Membran nieder und lässt somit die Banden sichtbar werden. Nicht-modifiziertes HSA und Kreatinase wurden als Negativkontrollen eingesetzt, während Transferrin als Positivkontrolle fungierte.

Die genauen Verfahrensschritte sind im Beipackzettel zu diesem Kit beschrieben (Roche-Boehringer).

5.2 Die Fig. 8 und 9 zeigen jeweils eine Aufnahme des Silbergefärbten SDS-PAGE-Gels (oben) und die Aufnahme der entsprechenden Produkte nach Übertragung auf eine Membran und Glykannachweis (unten). Wie sich aus diesen Figuren entnehmen lässt, entsteht während der Kopplungsreaktion ein relativ homogenes Glykan als Reaktionsprodukt, während gleichzeitig die Konzentration an nicht-modifiziertem HSA abnimmt.

#### 20 Beispiel 6 Abklärung möglicher Nebenreaktionen:

Zur Klärung, ob Nebenreaktionen in Form einer Selbstkondensation von HES mit oxidierten reduzierenden Endgruppen erfolgen, wurden folgende Reaktionsansätze erstellt:

	ox-HES	EDC	HOBt	Wasser	Reaktionszeit
HES 130 kD	500 mg $1.2 \times 10^{-5}$ mol	15 mg $7.8 \times 10^{-5}$ mol	-	5.0 ml	30 h 25 °C
HES 130 kD	500 mg $1.2 \times 10^{-5}$ mol	15 mg $7.8 \times 10^{-5}$ mol	gesättigte Lösung	5.0 ml	30 h 25 °C
HES 10 kD	100 mg $2.7 \times 10^{-5}$ mol	3.4 mg $1.8 \times 10^{-5}$ mol	-	5.0 ml	30 h 25 °C
HES 10 kD	100 mg $2.7 \times 10^{-5}$ mol	3.4 mg $1.8 \times 10^{-5}$ mol	gesättigte Lösung	5.0 ml	30 h 25 °C
HES 130 kD	700 mg $1.6 \times 10^{-5}$ mol	31 mg $1.6 \times 10^{-4}$ mol	-	5.0 ml	30 h 25 °C
HES 130 kD	700 mg $1.6 \times 10^{-5}$ mol	31 mg $1.6 \times 10^{-4}$ mol	gesättigte Lösung	5.0 ml	30 h 25 °C

**Tabelle 4: Reaktionsansätze zur Abklärung von Nebenreaktionen**

Ziel der Experimente war es, nachzuweisen, inwieweit eine mögliche Selbstkondensation von HES in Gegenwart oder Abwesenheit von HOBT stattfindet. Die Proben wurden lyophilisiert und analysiert.

Mittels GPC und Streulichtmessungen konnten innerhalb der Detektionsgrenzen von einigen Prozent keine Hinweise auf Molekulargewichtsvergrößerungen gefunden werden.

**Beispiel 7: Kopplung von oxidiertem HES an DNA und Analyse der Funktionalität der Kopplungsprodukte****Reaktionsprinzip:**

Eine schematische Darstellung der Reaktion findet sich in Fig. 10. Im ersten Schritt reagiert die Aminogruppe der Amin-HES12KD 3 mit der N-Hydroxysuccinimid-gruppe des SMCC 4 zum Konjugat 5. Durchs Zentrifugieren mit dem Zentrifugen-Dialyseeinsatz wird nicht reagiertes SMCC 4 abgetrennt. Die Maleimid-Gruppe des Konjugats 5 reagiert dann mit der Thiol-Gruppe der Thio-DNA 1 zum dem gewünschten Produkt 6. Der in 6 fett markierte Bereich ist nur ein Spacer und kann jede Gestalt haben.

Die Überprüfung der biologischen Aktivität des Konjugates 6 erfolgte über die Spaltung durch das Restriktionsenzym EcoRI. Ein Restriktionsenzym schneidet nur doppelsträngige DNA mit intakter Erkennungssequenz.

**DNA:**

Verwendet wurde doppelsträngige DNA, synthetisiert von MWG Biotech AG, Ebersberg. Die Sequenzen der Einzelstränge lauten:

SEQ ID NO. 1: 5' - GTAGAGACAGGAGGCAGCAGTTGAATTCGCAGGGT-GAGTAGCAGTAGAGC-3' ;

SEQ ID NO. 2: 5' - GCTCTACTGCTACTCACCCTGCGAATT-CAACTGCTGCCTCCTGTCTCTAC-3' ;

modifiziert mit 5' Thiol C6 S-S durch MWG (vgl. Fig.10).

Die beiden DNA Einzelstränge wurden in bidest. Wasser in einer Konzentration von je 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  gelöst und im Verhältnis 1 : 1 bei 5 96°C zu einer doppelsträngigen Thio-DNA 1 mit einer Konzentration von 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  hybridisiert.

#### Analyse der Produkte:

Die Analyse erfolgte durch Gelelektrophorese in einem 4% Agarose- 10 Gel mit einem TBE-Laufpuffer aus 45 mM Tris-Borat, 1mM EDTA, pH 8.0 von je 1  $\mu\text{g}$  DNA in Gegenwart von 50  $\mu\text{g}$  Ethidiumbromid pro 100 ml Gel. Die Fotos wurden aufgenommen mit einem CCD-System Modular (INTAS Imaging Instruments, Göttingen, D) und einem UV-Transillu- minator UVT-20 S/M/L (Herolab GmbH, Wiesloch, D) bei 312 nm.

15

Vom Reaktionsgemisch wurden 1  $\mu\text{L}$  (1 $\mu\text{g}$  DNA) abgenommen und geschnitten mit 1  $\mu\text{L}$  (20 U) EcoRI- Restriktionsenzym (New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus, D), 1  $\mu\text{L}$  Reaktionspuffer (50 mM Natriumchlorid, 100 mM Tris-HCl, 10 mM Magnesiumchlorid, 0,025% 20 Triton X-100, pH 7.5 von New England Biolabs) und 7 $\mu\text{L}$  bidest. Wasser bei 37°C für 3h.

#### Modifikation der HES

Die Oxidation von HES12KD (Fresenius, Charge 2540SR2.5P) mit 25 einem mittleren Molgewicht von 12000 g/mol mit Iod-Lösung zum Oxo-HES12KD 2 wurde nach den in DE 19628705 offenbarten Verfahren durchgeführt.

Reaktion von 1,4-Diaminobutan mit Oxo-HES12KD 2:

30 1,44 g (0,12 mmol) des Oxo-HES12KD 2 wurden in ml wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, unter Stickstoff zu einer Lösung aus 1.5 ml (1,50 mmol)-1,4 Diaminobutan getropft und bei 40°C für 19 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zu einem Gemisch aus 80 ml Ethanol und 80 ml Aceton gegeben. Der gebildete Niederschlag 35 wurde abzentrifugiert und in 40 ml Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde für 4 Tage gegen Wasser dialysiert (SnakeSkin Dialyses- schlauch, 3.5 KD cut off, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn,

- 44 -

D) und anschließend gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 80% (1.06 g) Amino-HES12KD 3.

#### Kopplung von Amino-HES12KD 3 an Thio-DNA 1.

- 5 Zu 400  $\mu$ L einer 10 mg/mL-Lösung aus Amino-HES12KD 3 in einem Puffer aus 10 mM Natriumphosphat und 150 mM Natriumchlorid, pH 7.44, wurden 1 mg SMCC 4 gelöst in 50  $\mu$ L wasserfreiem DMSO gegeben und das Gemisch 80 min bei Raumtemperatur und 10 min bei 46°C behandelt. Dann wurde das Gemisch abzentrifugiert, der
- 10 Überstand vom Niederschlag abgenommen und erneut zentrifugiert. Vom Überstand wurden 200  $\mu$ L abgenommen und 45 min bei 14000 g mit einem MICROCON YM-3 (Amicon, Millipore GmbH, Eschborn, D) Zentrifugen-Dialyseeinsatz zentrifugiert. Nach Zugabe von 400  $\mu$ L Puffer aus 10 mM Natriumphosphat und 150 mM Natriumchlorid, pH
- 15 7.44 wurde erneut für 45 min zentrifugiert, weitere 400  $\mu$ L Puffer zugegeben und 60 min zentrifugiert. Die im Dialyseeinsatz verbliebene Menge an Konjugatlösung wurde auf 50  $\mu$ L aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden 10  $\mu$ L zu 10  $\mu$ L der Thio-DNA-Lösung 1 gegeben und 14 h bei Raumtemperatur reagieren lassen. Zur Analyse
- 20 wurden 1  $\mu$ L abgenommen. Die Ergebnisse zeigt Fig. 11 in Bahn 2 und 3.

Die Reaktionsbedingungen für den beschriebenen Versuch und für Versuche mit abgewandelten Reaktionsbedingungen sind in der

25 Tabelle 1 zusammengefasst und die Ergebnisse im Fig. 11 dargestellt.

#### Zusammenfassung der Ergebnisse:

Es wurden folgende Bedingungen untersucht:

- 30 1. Menge an SMCC: 1 mg (Bahnen 2, 6, 10, 14) bzw. 5.6 mg (Bahnen 4, 8, 12, 16);
2. Temperatur für die Reaktion mit der Thio-DNA 1:  
Raumtemperatur (Bahnen 2, 4, 6, 8) bzw. 37°C (Bahnen 10, 12, 14, 16);
- 35 3. Pufferbedingungen:  
10 mM Phosphat, 150 mM NaCl ohne EDTA, pH 7.44 (Bahnen 2, 4, 10, 12) bzw;

- 45 -

100 mM Phosphat, 150 mM NaCl + 50 mM EDTA, pH 7,23 (Bahnen 6, 8, 14, 16)

In Figur 11, Bahnen 2-18 sind die Ergebnisse der 8 Kopplungsver-  
 5 suchen von Amino-HES12KD 3 an die Thio-DNA 1 mit Hilfe von SMCC  
 dargestellt. Dabei sind die Ergebnisse direkt aus der Reaktion  
 bzw. nach der Reaktion und anschließendem Schneiden der DNA  
 nebeneinander dargestellt. In Bahn 1 ist ein Gemisch verschiede-  
 ner Referenz-DNAs als Längenmarker aufgetragen und die Bahnen 18  
 10 und 19 zeigen Thio-DNA 1 bzw. geschnittene Thio-DNA 1. Alle  
 Versuche zeigen zusätzlich zu noch nicht umgesetzter Thio-DNA 1  
 Kopplungsprodukte bei höheren Massen (Bahnen 2, 4, 6, 8, 10, 12,  
 14, 16). Da HES12KD ein Gemisch unterschiedlich großer Moleküle  
 ist, zeigen auch die Kopplungsprodukte eine Molgewichtsver-  
 15 teilung. Alle Kopplungsprodukte enthalten intakte DNA, da sie von  
 EcoR1 vollständig verdaut werden können. Dies zeigt sich im fast  
 vollständigen Verschwinden der entsprechenden diffusen Banden  
 nach dem Schneiden (Bahnen 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17).

20 Tabelle 1: Reaktionsbedingungen der Kopplung von Amino-HES12KD 3  
 an die Thio-DNA 1

Bahn	Versuch	Temp [°C]	SMCC[mg]	DNA	HES12KD	Puffer	
	1 Marker						
25	2 19A1	RT	1	Thio-DNA	Amino-HES12KD	7.44, 10mM	
	3						geschnitten
	4 19B1	RT	5.6	Thio-DNA	Amino-HES12KD	7.44, 10mM	
	5						geschnitten
30	6 19C1	RT	1	Thio-DNA	Amino-HES12KD	7.23, 100mM	
	7						geschnitten
	8 19D1	RT	5.6	Thio-DNA	Amino-HES12KD	7.23, 100mM	
	9						geschnitten
	10 19A2	37°C	1	Thio-DNA	Amino-HES12KD	7.44, 10mM	
	11						geschnitten
35	12 19B2	37°C	5.6	Thio-DNA	Amino-HES12KD	7.44, 10mM	
	13						geschnitten
	14 19C2	37°C	1	Thio-DNA	Amino-HES12KD	7.23, 100mM	
	15						geschnitten
	16 19D2	37°C	5.6	Thio-DNA	Amino-HES12KD	7.23, 100mM	
40	17						geschnitten
	18			Thio-DNA			
	19						geschnitten

Patentansprüche

1. HAS-Wirkstoff-Konjugat, erhältlich durch Verfahren zur Herstellung eines kovalenten HAS-Wirkstoff-Konjugates, bei dem man HAS und einen Wirkstoff in einem Reaktionsmedium miteinander umsetzt, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsmedium Wasser oder ein Gemisch von Wasser mit organischem Lösungsmittel, welches mindestens 10 Gew.-% Wasser umfaßt, ist.
2. Verbindung, die ein Konjugat aus einer HAS und einem Wirkstoff umfaßt, wobei die HAS entweder unmittelbar oder über einen Linker kovalent an den Wirkstoff gebunden ist.
3. Verbindung gemäß Anspruch 1 oder 2, in welcher der Wirkstoff ein Vitamin, Impfstoff, Toxin, Antibiotikum, Antiarrythmikum, Appetitzügler, Anästhetikum, Analgetikum, Antirheumatikum, Antiallergikum, Antiasthmatikum, Antidepressivum, Antidiabetikum, Antihistaminikum, Antihypertonikum, oder ein antineoplastisches Mittel ist.
4. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, in welcher der Wirkstoff ein Hormon, Steroid, Lipid, Protein, Oligo- oder Polypeptid oder eine Nukleinsäure, insbesondere eine D- oder L-Nukleinsäure, wie beispielsweise eine D-DNA, L-DNA, D-RNA oder L-RNA ist.
5. Verbindung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, in welcher der Wirkstoff ein Enzym, Enzym-Inhibitor, Rezeptor, Rezeptor-Fragment, Insulin, Faktor VIII, Faktor IX, Zytokin, Interferon, Interleukin, Wachstumsfaktor, Peptid-Antibiotikum, virales Hüll-Protein, Hämoglobin, Erythropoietin, Albumin, hTPA, Antikörper, Antikörperfragment, Einzelketten-Antikörper oder ein Derivat davon ist.



6. Verbindung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, in welcher der Wirkstoff ein Steroidhormon, ein von Aminosäuren abgeleitetes Hormon oder ein von Fettsäuren abgeleitetes Hormon ist.
7. Verbindung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, in die HAS an die  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe, an die  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe, an die SH-Gruppe an eine COOH-Gruppe oder an eine -C(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-Gruppe eines Wirkstoffes bindet.
8. Verbindung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, in der die HAS Hydroxyethylstärke ist und vorzugsweise ein mittleres Molekulargewicht (Gewichtsmittel) von 1 bis 300 kDa, vorzugsweise von 5 bis 200 kDa, aufweist.
9. Verbindung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, in der die Hydroxyethylstärke einen molaren Substitutionsgrad von 0,1 bis 0,8 und ein Verhältnis von C<sub>2</sub> : C<sub>6</sub>-Substitution im Bereich von 2 bis 20, jeweils bezogen auf die Hydroxyethylgruppen, aufweist.
10. Verbindung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, in der der antineoplastische Wirkstoff aus der Gruppe bestehend aus Alkylantien, Antimetaboliten, Antibiotika oder Naturstoffen ausgewählt wurde.
11. Verbindung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, in der der antineoplastische Wirkstoff Mitomycin C, Cyclophosphamid, Bleomycin, Chlorambucil, Cisplatin, Ara-C, Fludarabin, Doxorubicin, Etoposid, 5-FU, MTX, Vinblastin, Vincristin, Vindesin, Hydroxyurea, 6-MP oder CCNU ist.
12. Verbindung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, in der der antineoplastische Wirkstoff an die reduzierenden Endgruppen der Hydroxyethylstärke gebunden ist.

- 48 -

13. Verbindung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, in der der antineoplastische Wirkstoff Mitomycin C ist.
14. Verbindung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, in der Hydroxyethylstärke an die Methoxy-Gruppe des Mitomycin C gekoppelt ist.
15. Verbindung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, in der Hydroxyethylstärke über einen Linker an die Methoxy-Gruppe des Mitomycin C gekoppelt ist.
16. Pharmazeutische Zusammensetzung, welche eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 aufweist.
17. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 16, die ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger aufweist.
18. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 16 oder 17, die zusätzlich ein Zytokin umfaßt.
19. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18, in der das Zytokin IL-2,  $\alpha$ -Interferon oder  $\gamma$ -Interferon ist.
20. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 10-15 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumoren und/oder deren Metastasen.
21. Verwendung gemäß Anspruch 20 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von urologischen Tumoren und/oder Metastasen urologischer Tumore.
22. Verwendung gemäß Anspruch 21 zur Herstellung eines Arzneimittels wobei das Arzneimittel zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms oder zur Behandlung von Metastasen des Nierenzellkarzinoms verwendet wird.

23. Verwendung gemäß Anspruch 22 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung des klarzelligen oder chromophilen Nierenzellkarzinoms oder Metastasen derselben.
24. Verwendung gemäß Anspruch 20, wobei das Arzneimittel zur Behandlung lymphatischer Systemerkrankungen verwendet wird.
25. Verwendung gemäß Anspruch 24, bei der die lymphatische Systemerkrankung CLL, Hodgkin-Lymphom, NHL, multiples Myelom, Morbus Waldenström ist.
26. Verwendung gemäß Anspruch 25, wobei als antineoplastischer Wirkstoff Fludarabin verwendet wird.
27. Verwendung gemäß Anspruch 20, bei der der Tumor ein kutanes/lokales primäres Malignom oder dessen Metastasen ist.
28. Verwendung gemäß Anspruch 27, bei der der Tumor eine hämatologische Systemerkrankung oder eine onkologische Erkrankung ist, beispielsweise ein nicht-kleinzelliges und kleinzelliges Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Ösophagus-Plattenepithelkarzinom, Nierenzellkarzinom, Hodenkarzinom, malignes Melanom, ALL oder CML ist.
29. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 28, bei der das Arzneimittel ferner ein Zytokin umfaßt.
30. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 29, bei der das Zytokin IL-2,  $\alpha$ -Interferon oder  $\gamma$ -Interferon ist.
31. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der der antiarrhythmische Wirkstoff aus der Gruppe bestehend aus Natriumkanal-Blocker, Beta-Rezeptoren-Blocker, selektive Repolarisationsverlängerer, Calcium-Antagonisten und Lokalanästhetika ausgewählt wurde.

- 50 -

32. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der der antiarrhythmische Wirkstoff Adenosin, Chinidin, Procainamid, Disopyramid, Lidocain, Phenytoin, Mexiletin, Ajmalin, Parjmalium, Propafenon, Atenolol, Propanolol, Amiodaron, Sotalol, Verapamil, Gallopamil oder Diltiazem ist.
33. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der der antiarrhythmische Wirkstoff an die reduzierenden Endgruppen der Hydroxyethylstärke gebunden ist.
34. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der der antiarrhythmische Wirkstoff Adenosin ist.
35. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der der antiarrhythmische Wirkstoff Adenosin ist, welcher über die Aminogruppe an Hydroxyethylstärke gebunden ist.
36. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der der antiarrhythmische Wirkstoff über einen Linker an die Hydroxyethylstärke gekoppelt ist.
37. Pharmazeutische Zusammensetzung, welche eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 31 bis 36 umfaßt.
38. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 37, die ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfaßt.
39. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 31-36 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Herzrhythmusstörungen, insbesondere ventrikulären Herzrhythmusstörungen.
40. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 37-36 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Induktion von Apoptose, wobei die Apoptose bevorzugt in Tumorgewebe induziert wird.

41. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der der Wirkstoff ein antiinfektiver Wirkstoff beziehungsweise ein Antibiotikum ist, vorzugsweise aus der Gruppe bestehend aus Aminopenicilline, Cephalosporine und Aminocephalosporine, Beta-Laktam-Antibiotika, Carbapeneme, Aminoglycoside, Tetracycline, Makrolid-Antibiotika, Gyrasehemmer, Glycopeptid-Antibiotika, Lincomycine, Streptogramine, Everninomicine, Oxazolidinone, Nitroimidazole, Sulfonamide, Cotrimoxazol, Lokalantibiotika, Virustatika, Antimycotika, Tuberculostatika, ausgewählt.
42. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der der antiinfektive Wirkstoff Ampicillin, Amoxicillin, Cefotaxim, Ceftazidim, Vancomycin, Clindamycin, Metronidazol, Isoniazid, Rifampicin, Rifabutin, Rifapentin, Ethambutol, Pyracinamid, Streptomycin, Prothionamid oder Dapson ist.
43. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der der antiinfektive Wirkstoff ein Aminopenicillin, wie Ampicillin, Amoxycillin, Makrolid oder Streptomycin ist.
44. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der der Wirkstoff ein Aminopenicillin ist und die kovalente Kopplung unmittelbar an Hydroxyethylstärke über die Amino-Gruppe des Aminopenicillins erfolgt.
45. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der der antiinfektive Wirkstoff Erythromycin oder ein Derivat davon ist.
46. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der das Erythromycin-Derivat Erythromicylamin ist
47. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der der antiinfektive Wirkstoff Streptomycin ist.

48. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der der antiinfektive Wirkstoff an die reduzierenden Endgruppen der Hydroxyethylstärke gebunden ist.
49. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der der antiinfektive Wirkstoff über einen Linker an die Hydroxyethylstärke gekoppelt ist.
50. Pharmazeutische Zusammensetzung, welche eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 41 bis 49 aufweist.
51. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 51, die ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger aufweist.
52. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 41-49 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer Infektionskrankheit.
53. Verwendung gemäß Anspruch 52, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Infektionserkrankungen geeignet ist, welche unter anderem durch intrazelluläre Erreger verursacht werden.
54. Verwendung gemäß Anspruch 52 oder 53, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Infektionserkrankungen geeignet ist, welche durch pathogene oder fakultativ pathogene Erreger verursacht werden, z.B. bakterielle, virale oder parasitäre Erreger, Mykoplasmen, Mycobakterien, Chlamydien oder Rickettsien.
55. Verfahren zur Herstellung eines kovalenten HAS-Wirkstoff-Konjugates, bei dem man HAS und einen Wirkstoff in einem Reaktionsmedium miteinander umsetzt, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsmedium Wasser oder ein Gemisch von Wasser mit organischem Lösungsmittel, welches mindestens 10 Gew.-% Wasser umfaßt, ist.

56. Verfahren nach Anspruch 55, bei dem der Wirkstoff ein Vitamin, Impfstoff, Toxin, Antibiotikum (Antiinfektivum), Antiarrhythmikum, Appetitzügler, Anästhetikum, Analgetikum, Antirheumatikum, Antiallergikum, Asthmasthmatikum, Antidepressivum, Antidiabetikum, Antihistaminikum, Antihypertonikum, oder ein antineoplastisches Mittel ist.
57. Verfahren nach Anspruch 55 oder 56, bei dem der Wirkstoff ein Hormon, Steroid, Lipid, Protein, Oligo- oder Polypeptid oder eine Nukleinsäure ist.
58. Verfahren nach einem der Ansprüche 55 bis 57, bei dem der Wirkstoff ein Enzym, Enzym-Inhibitor, Rezeptor, Rezeptor-Fragment, Insulin, Faktor VIII, Faktor IX, Zytokin, Interferon, Interleukin, Wachstumsfaktor, Peptid-Antibiotikum, virales Hüll-Protein, Hämoglobin, Erythropoietin, Albumin, hTPA, Antikörper, Antikörperfragment, Einzelketten-Antikörper, eine Nukleinsäure, insbesondere eine D- oder L-Nukleinsäure, wie beispielsweise eine D-DNA, L-DNA, D-RNA oder L-RNA oder ein Derivat davon ist.
59. Verfahren nach einem der Ansprüche 55 bis 58, bei dem der Wirkstoff ein Steroidhormon, ein von Aminosäuren abgeleitetes Hormon oder ein von Fettsäuren abgeleitetes Hormon ist.
60. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem man HAS an die  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe, an die  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe, an die SH-Gruppe an eine COOH-Gruppe oder an eine -C(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-Gruppe des Wirkstoffes bindet.
61. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem man HAS vor Bindung an den Wirkstoff oxidiert.
62. Verfahren nach Anspruch 61, bei dem man die reduzierende Endgruppe der HAS selektiv oxidiert.

63. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem die oxidierte reduzierende Endgruppe HAS mit einer Aminogruppe des Wirkstoffes unter Ausbildung eines Amides reagiert.
64. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem man eine Aminogruppe des Wirkstoffes mit HAS so umsetzt, dass eine Schiff'sche Base gebildet wird.
65. Verfahren nach Anspruch 64, bei dem die Azomethin-  
gruppe  $-\text{CH}=\text{N}-$  der Schiff'schen Base zu einer Methylen-  
amingruppe  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$  reduziert wird.
66. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem als Reduktionsmittel  $\text{BH}_3$  verwendet wird.
67. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem man den Wirkstoff oder HAS vor der Herstellung des Konjugates an einen Linker bindet.
68. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem man Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht (Gewichtsmittel) von 1 bis 300 kDa verwendet.
69. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem man Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht von 2 bis 40 kDa verwendet.
70. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem man Hydroxyethylstärke mit einem molaren Substitutionsgrad von 0,1 bis 0,8 und ein Verhältnis von  $\text{C}_2$  :  $\text{C}_6$ -Substitution im Bereich von 2 bis 20, jeweils bezogen auf die Hydroxyethylgruppen, verwendet.
71. Verfahren zur Herstellung eines Arznei- oder Diagnosemittels, umfassend Schritte bei denen man ein HAS-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 55 bis 70 herstellt und



- 55 -

mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, Adjuvans oder Hilfsstoff vermischt.

72. Arzneimittel, erhältlich nach Anspruch 71.

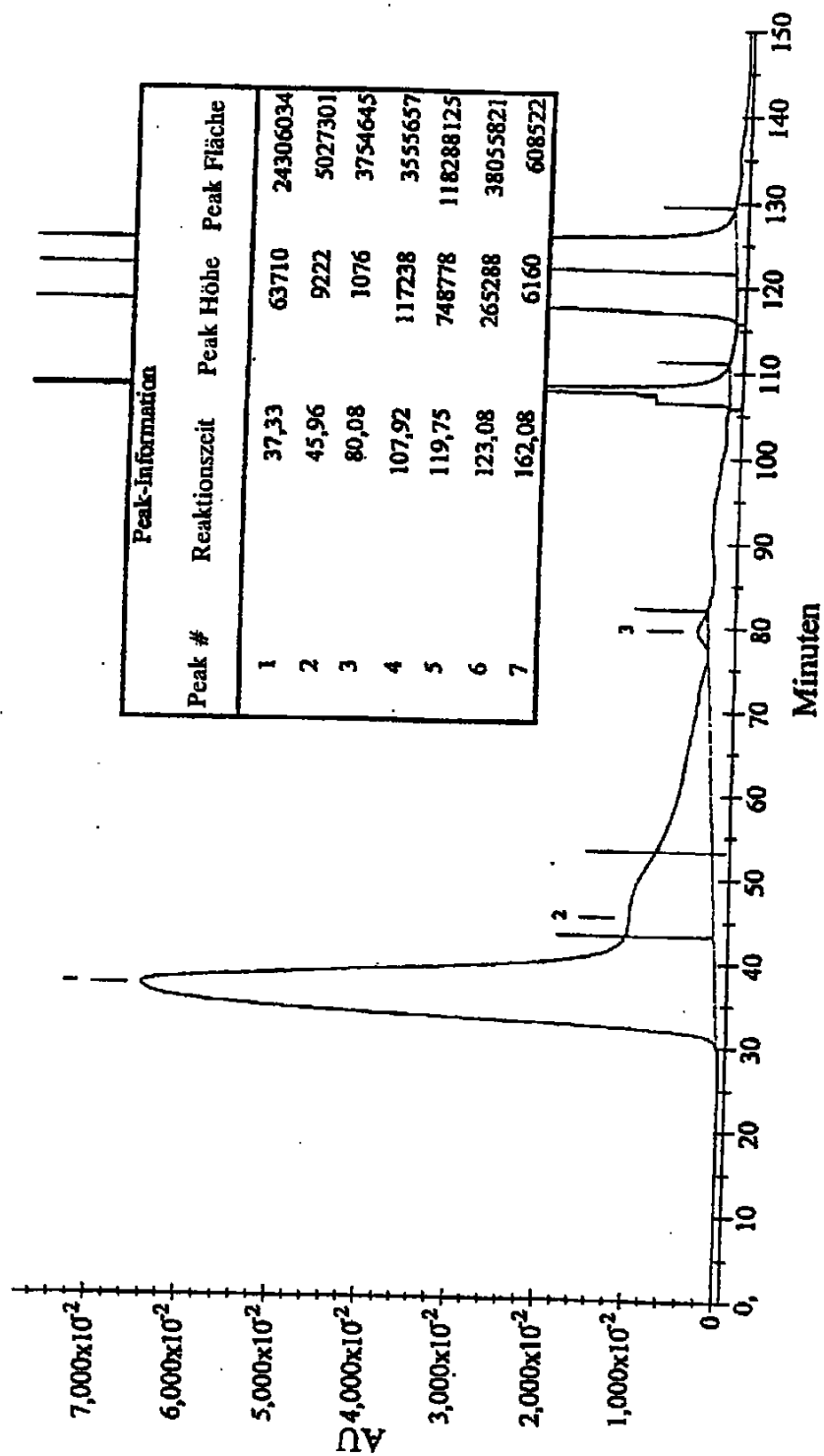


Fig. 1: GPC Chromatogramm der Kopplung III ox-HES 130 kD an HSA

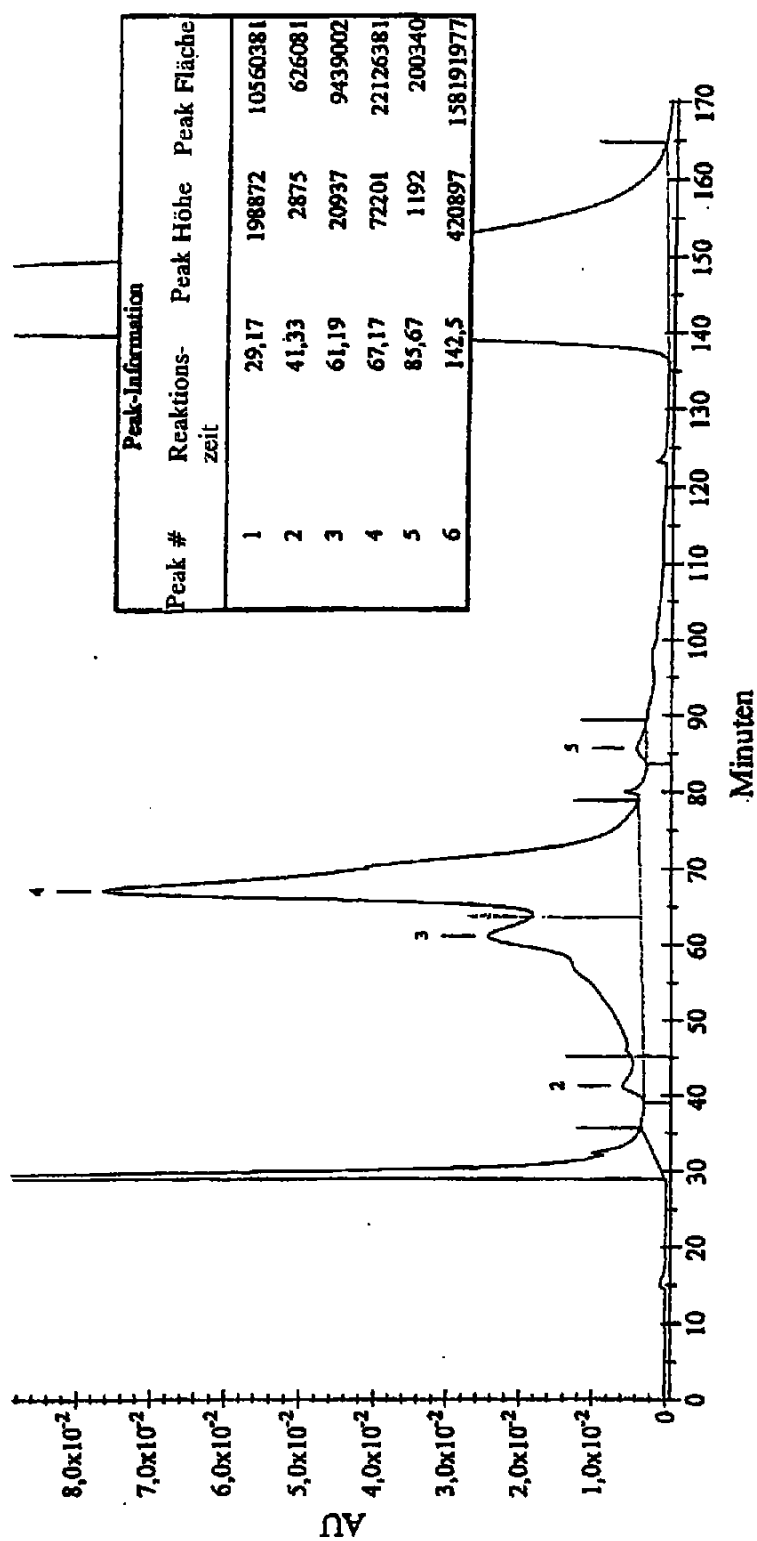


Fig. 2: GPC Chromatogramm der Kopplung IV ox-HES 130 kD an HSA

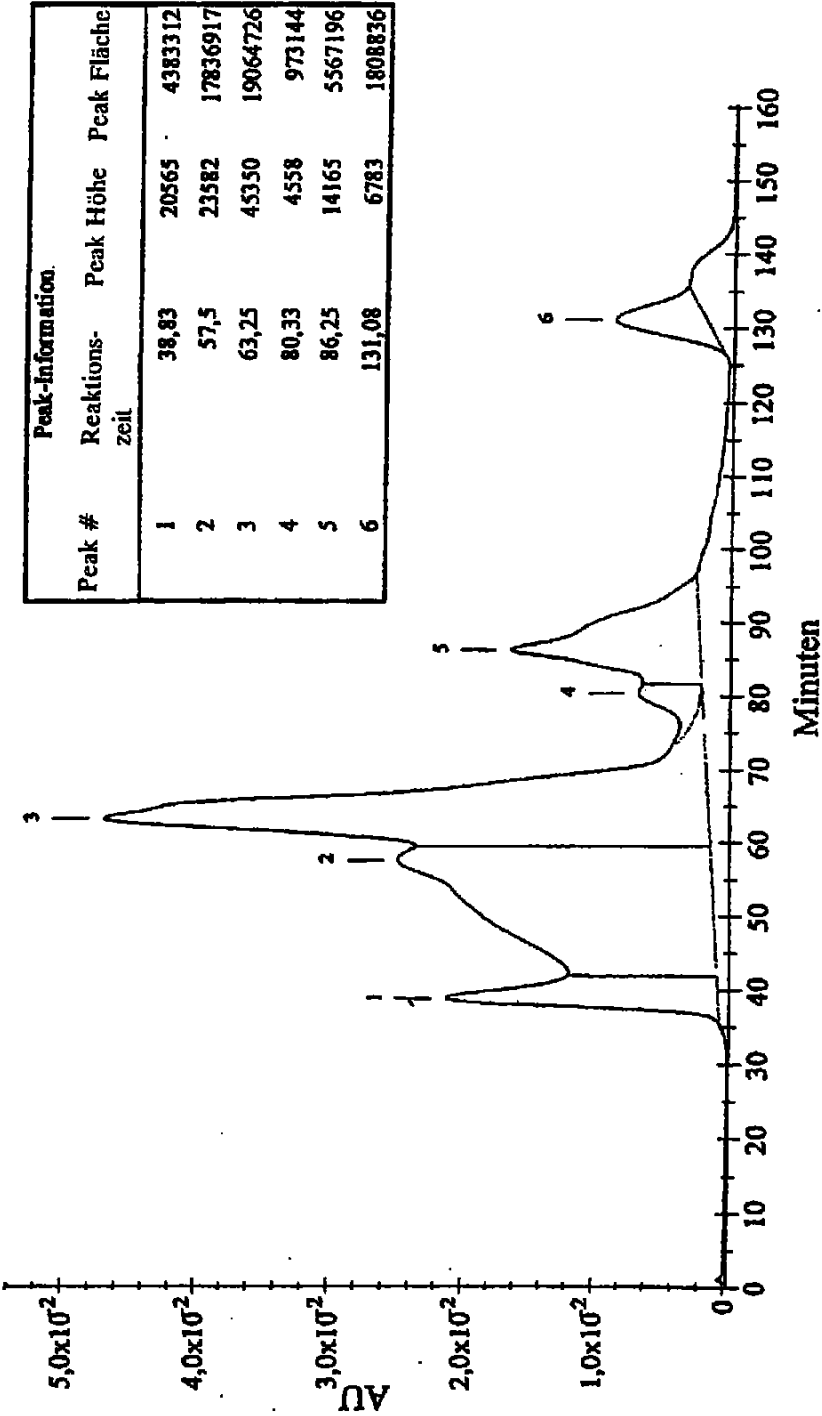


Fig. 3: GPC Chromatogramm der Kopplung v ox-HES 130 kD an HSA (Reaktionszeit 2 h)

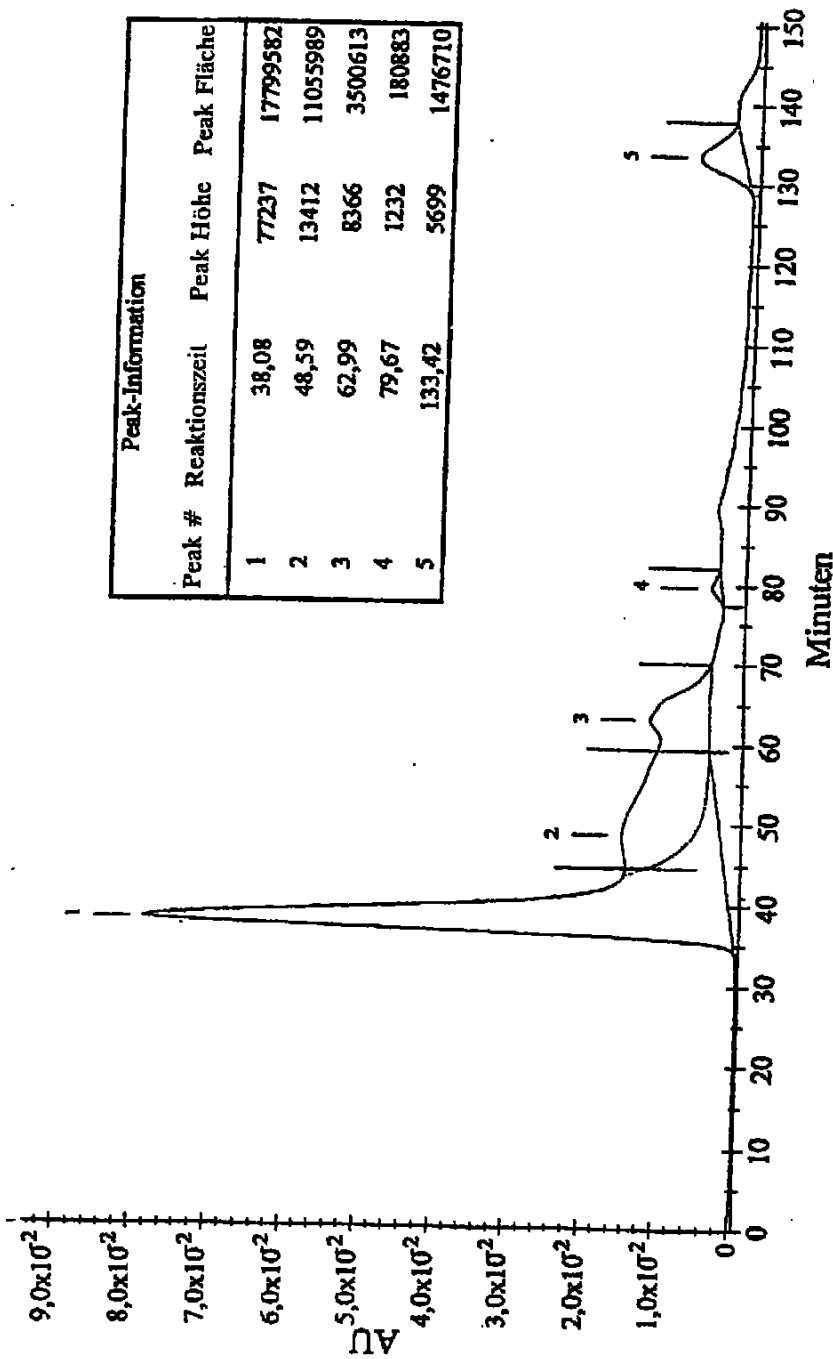


Fig. 4: GPC Chromatogramm der Kopplung v ox-HES 130 kD an HSA (nach vollständiger Reaktion)

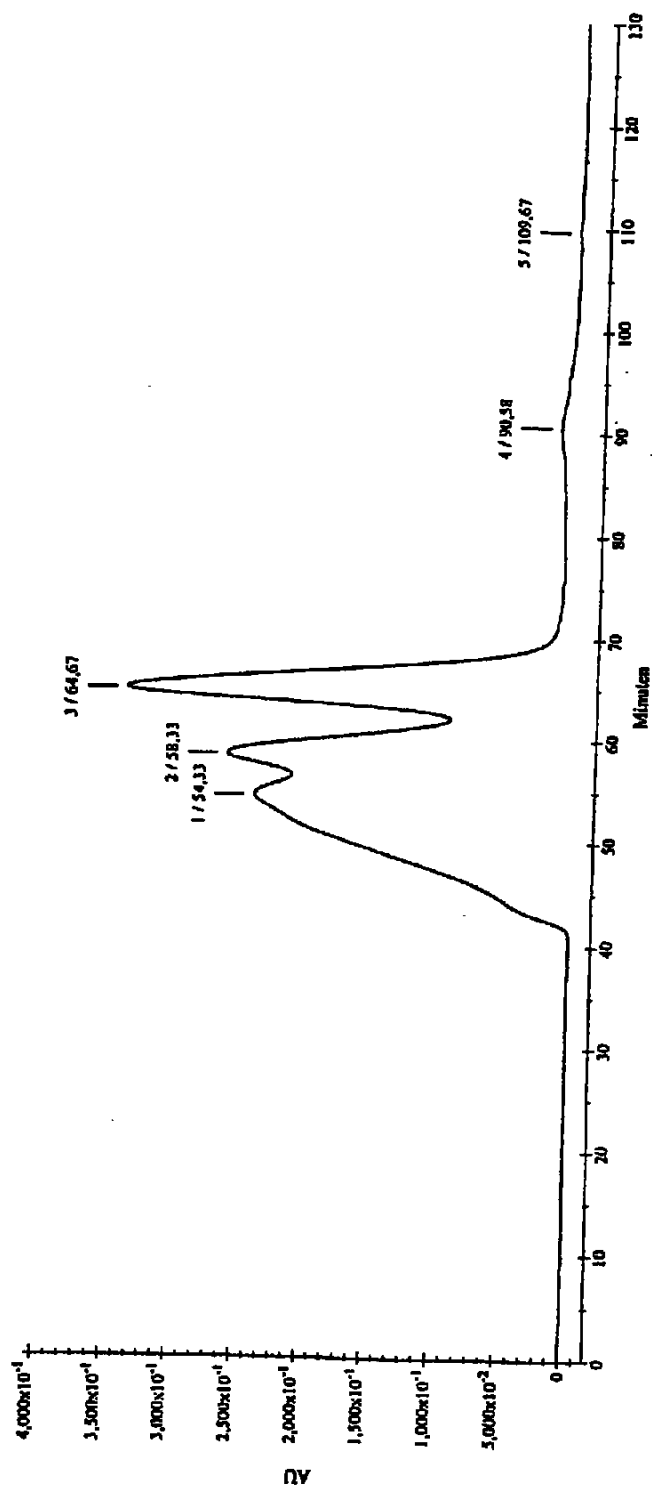


Fig. 5a: GPC-Analytik der Reaktionskinetik der V. Kopplung ox-HES 10 kD an HSA nach 2 h

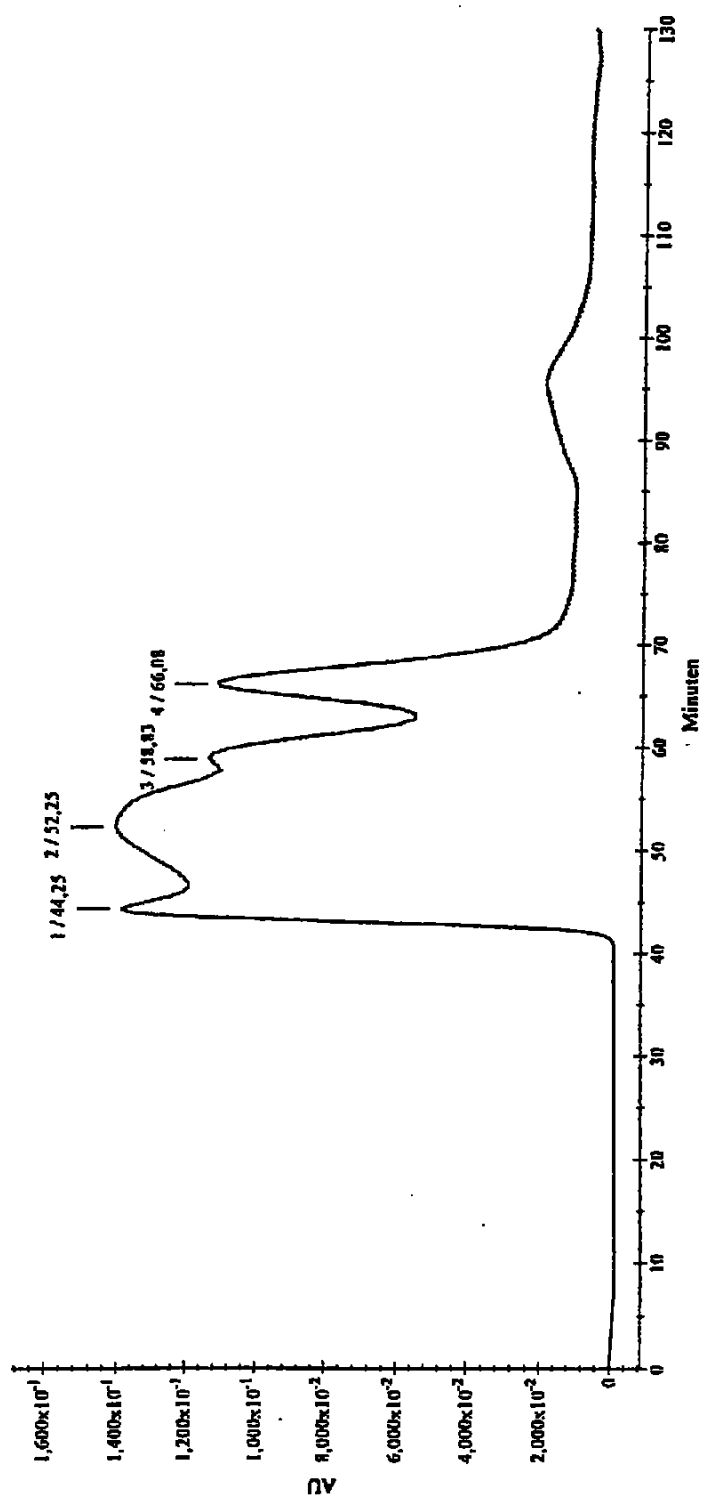


Fig. 5b: GPC-Analytik der Reaktionskinetik der v. Kopplung ox-HES 10 kD an HSA nach 16 h

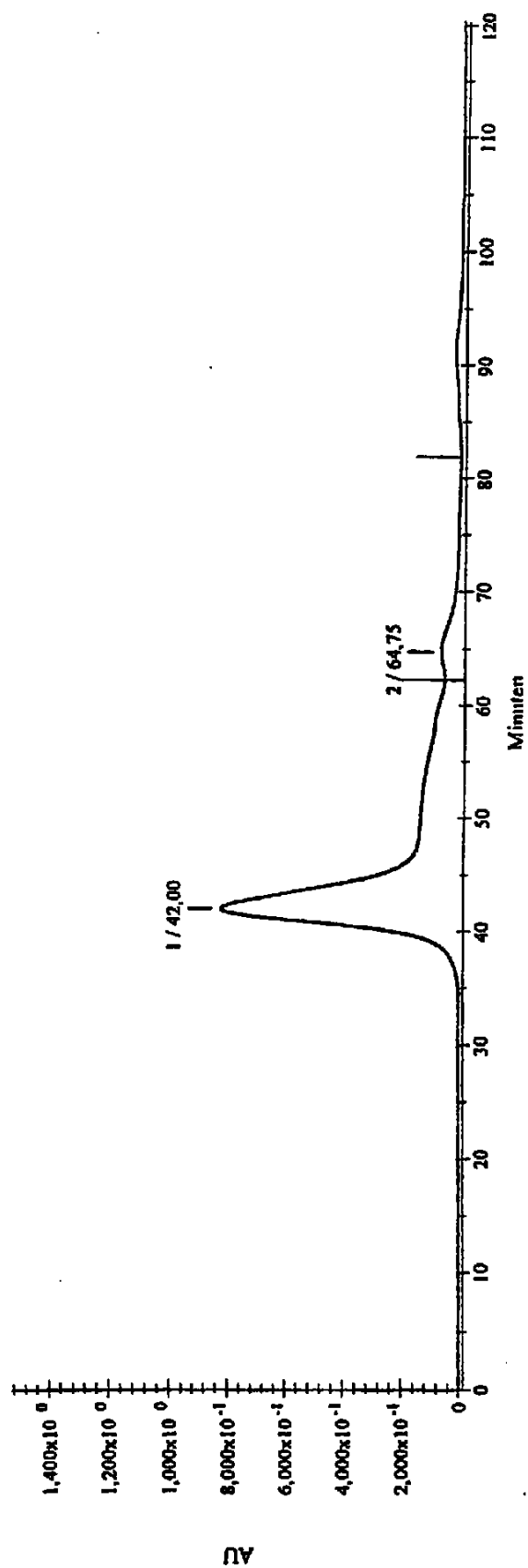


Fig. 6: GPC-Analytik des Reaktionsgemisches nach 24 h Inkubation  
der VII. Kopplung ox-HES 130 kD an HSA



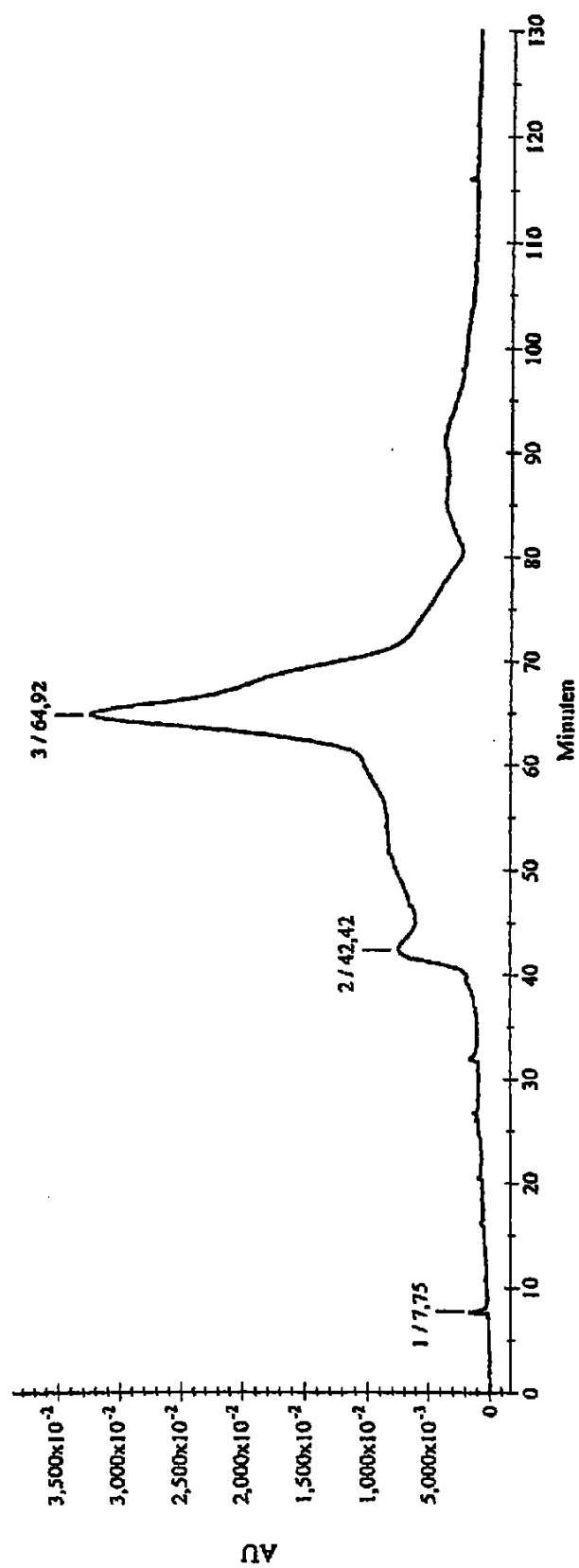


Fig. 7: GPC-Chromatogramm V. Kopplung HES 130 kD an HSA und Borhydridreduktion

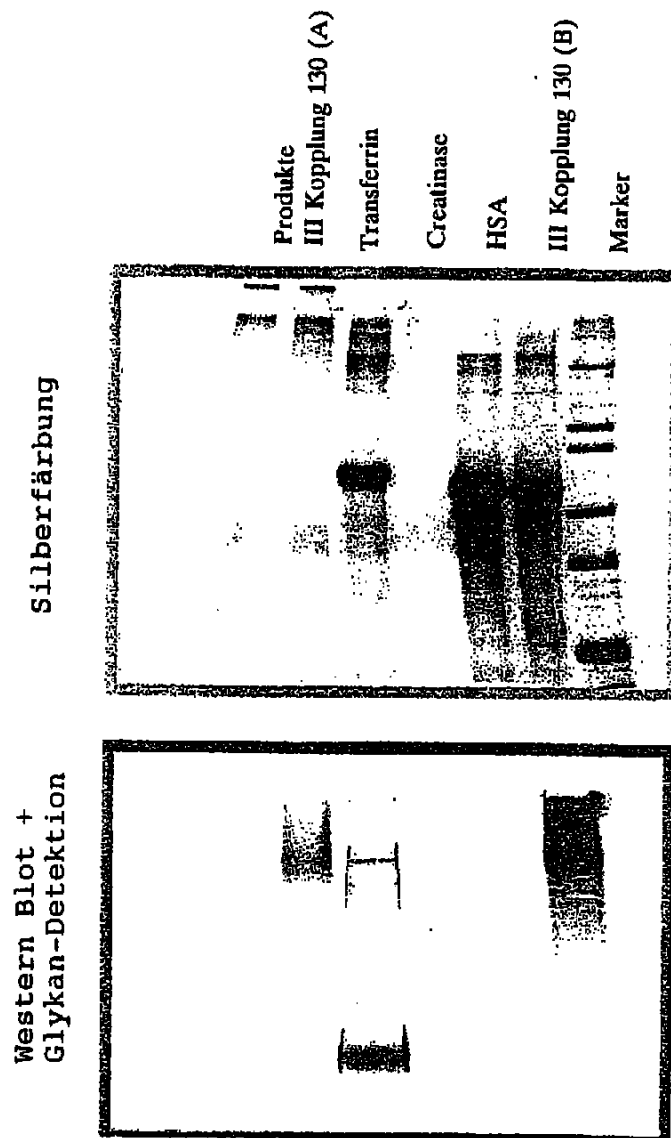


Fig. 8: Obere Aufnahme: SDS-PAGE der Kopplungsreaktionen III (Verfahren A und B) zwischen HSA und oxHES 130 kD und HES 130 kD, respektive, mit Silberfärbung (Bahn 1: Kopplung III Verfahren A); Bahn 2: Transferrin; Bahn 3: Creatinase; Bahn 4: nicht-modifiziertes HSA; Bahn 5: Kopplung III (Verfahren B); Bahn 6: Marker).

Untere Aufnahme: Western Blot mit Glykan-Nachweis derselben Proben, wobei Transferrin (Bahn 2) als Positiv-Kontrolle und Creatinase (Bahn 3) sowie HSA (Bahn 4) als Negativ-Kontrolle fungieren.

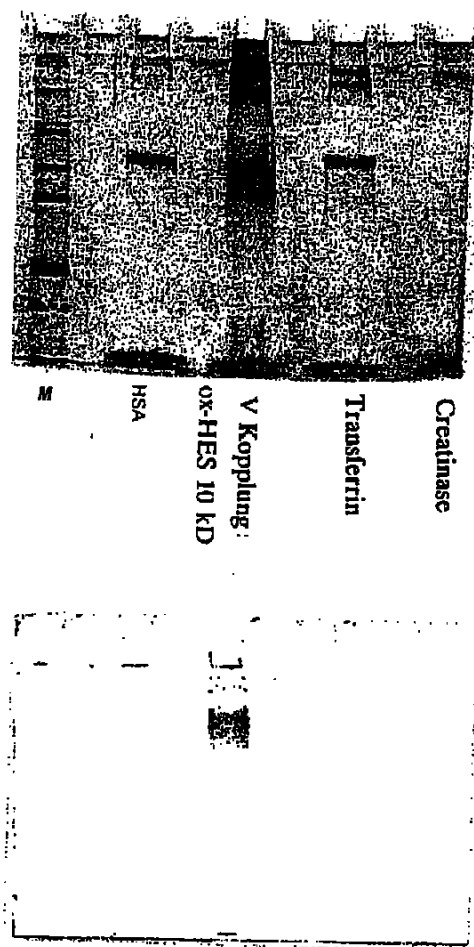


Fig. 9: SDS-PAGE, silbergefärbt, 12 % PAA (oben) und Western Blot/Glykan (unten) der Reaktionsmischung aus V. Kopplung ox-HES 10 kD mit HSA



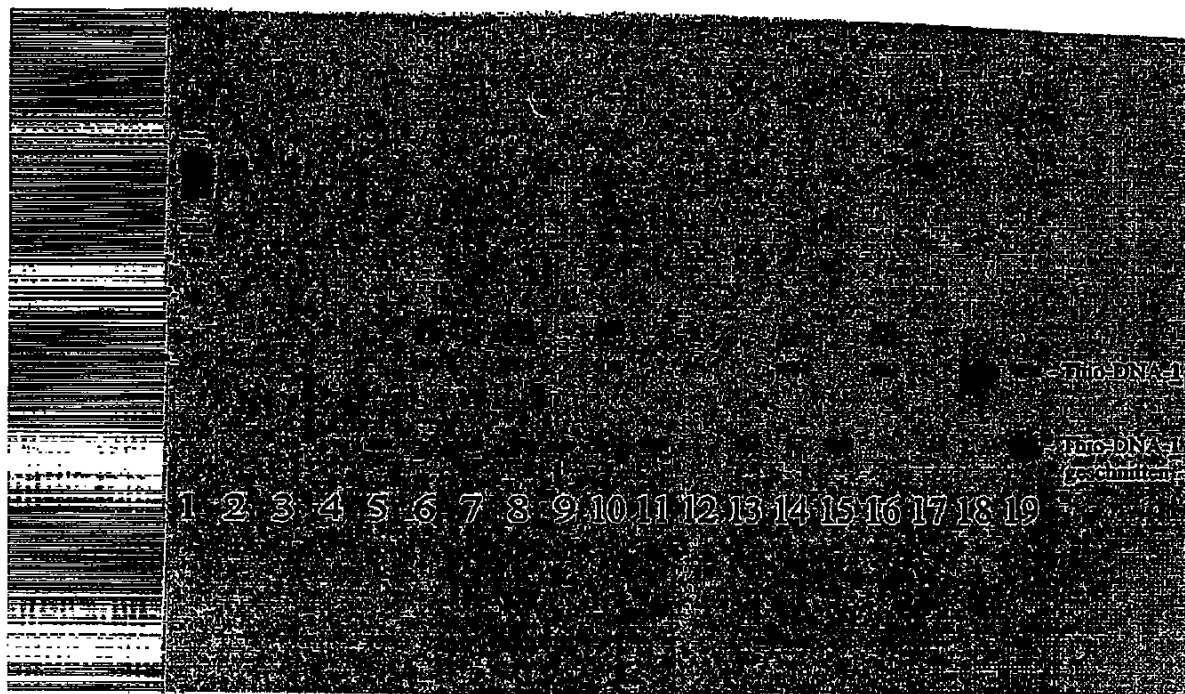


Fig. 11

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
17. Oktober 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/080979 A3

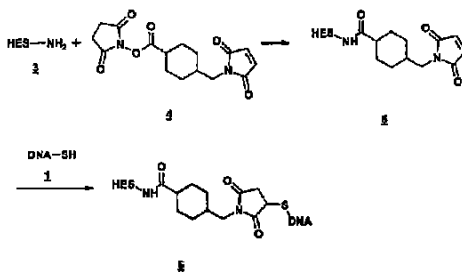
- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61K 47/48 (72) Erfinder; und  
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/02928 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SOMMERMEYER, Klaus [DE/DE]; In der Laubach 26, 61191 Rosbach (DE). EICHNER, Wolfram [DE/DE]; Richard Wagner Str. 12, 35510 Butzbach (DE). FRIE, Sven [DE/DE]; Heuchelheimerstr. 12, 61348 Friedberg (DE). JUNGHEINRICH, Cornelius [DE/DE]; Valkenierstr. 2b, 61350 Bad Homburg (DE). SCHARPE, Roland [DE/DE]; Vogelsbergstr. 3, 63691 Ranstadt (DE). LUTTERBECK, Katharina [DE/DE]; Am Holzpfortchen 7, 61169 Friedberg (DE).  
(22) Internationales Anmeldedatum: 15. März 2002 (15.03.2002)  
(25) Einreichungssprache: Deutsch  
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch  
(30) Angaben zur Priorität: 101 12 825.8 16. März 2001 (16.03.2001) DE (74) Anwälte: VON MENGES, A. usw.; Uexküll & Stolberg, Beselerstr. 4, 22607 Hamburg (DE).  
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND GMBH (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

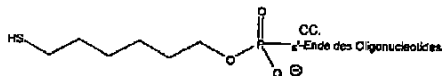
(54) Title: CONJUGATE OF HYDROXYALKYL STARCH AND AN ACTIVE AGENT

(54) Bezeichnung: HYDROXYALKYLSTÄRKE-WIRKSTOFF-KONJUGATE

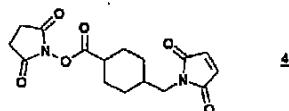
AA Schematische Darstellung der Kopplungsreaktion zwischen Amin-HES, SMCC und Thio-DNA.



BB Struktur der Thiomodifikation der DNA



DD Struktur des SMCC



AA...SCHEMATIC REPRESENTATION OF COUPLING REACTION BETWEEN AMIN-HES, SMCC AND THIO-DNA  
BB...STRUCTURE OF THIOMODIFICATION OF DNA  
CC...END OF OLIGONUCLEOTIDES  
DD...STRUCTURE OF THE SMCC

(57) Abstract: The invention relates to compounds, comprising a conjugate of hydroxyalkyl starch (HAS) and an active agent, whereby the hydroxyalkyl starch is either directly covalently bonded to the active agent, or by means of a linker. The invention further relates to methods for the production of a covalent HAS-active agent conjugate, whereby HAS and an active agent are reacted in a reaction medium, characterised in that the reaction medium is water or a mixture of water and an organic solvent, comprising at least 10 wt. % water.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen, die ein Konjugat aus Hydroxalkylstärke (HAS) und einem Wirkstoff umfassen, wobei die Hydroxalkylstärke entweder unmittelbar oder über einen Linker kovalent an den Wirkstoff gebunden ist. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Herstellung eines kovalenten HAS-Wirkstoff-Konjugates, bei denen man HAS und einen Wirkstoff in einem Reaktionsmedium miteinander umsetzt, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsmedium Wasser oder ein Gemisch von Wasser mit organischem Lösungsmittel, welches mindestens 10 Gew.-% Wasser umfasst, ist.

WO 02/080979 A3



CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen**

**Recherchenberichts:**

12. September 2003

- (84) Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 02/02928

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, DISSERTATION ABS, CANCERLIT, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>RICHTER A W ET AL: "ANTIBODIES AGAINST HYDROXYETHYLSTARCH PRODUCED IN RABBITS BY IMMUNIZATION WITH A PROTEIN-HYDROXYETHYLSTARCH CONJUGATE" INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND APPLIED IMMUNOLOGY, BASEL, CH, vol. 52, no. 1-4, 1976, pages 307-314, XP008014084 ISSN: 0020-5915 abstract page 308, left-hand column, last paragraph -right-hand column, paragraph 1.</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	<p>1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the International filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

14 April 2003

Date of mailing of the international search report

24/04/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Dullaart, A



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 02/02928

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 49897 A (HEMOSOL INC) 7 October 1999 (1999-10-07)  examples claims ---	1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72
Y	WO 98 01158 A (FRESENIUS AG ET AL.) 15 January 1998 (1998-01-15) cited in the application  example ---	1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72
Y	DE 30 29 307 A (FRESENIUS CHEM PHARM IND) 4 March 1982 (1982-03-04)  examples ---	1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72
Y	MAOUT ET AL: "Hydroxyethyl starch conjugated to human hemoglobin for use in blood transfusion: Comparison with dextran conjugates" CARBOHYDRATES AND CARBOHYDRATE POLYMERS: ANALYSIS, BIOTECHNOLOGY, CONFORMATION, MODIFICATION, ANTIVIRAL AND OTHER COMMERCIAL APPLICATIONS, XX, XX, vol. 1, 1993, pages 132-140, XP002107867 abstract figures tables ---	1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72
Y	SAKAI H ET AL: "Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: Objective comparison between cellular and acellular types" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 11, no. 1, 2000, pages 56-64, XP002957844 ISSN: 1043-1802 abstract figure 1 page 57, right-hand column, last paragraph -page 58, left-hand column, line 11 table 1 figure 3 ---  -/--	1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>TOYAMA S ET AL: "Surface design of SPR-based immunosensor for the effective binding of antigen or antibody in the evanescent field using mixed polymer matrix"</p> <p>SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, vol. 52, no. 1-2, 15 September 1998 (1998-09-15), pages 65-71, XP004157817</p> <p>ISSN: 0925-4005</p> <p>page 66, right-hand column, paragraph EXPERIMENTAL -page 67, left-hand column figure 1</p>	1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72
Y	<p>CERNY ET AL: "A hydroxyethyl starch - hemoglobin polymer as a blood substitute"</p> <p>CLINICAL HEMORHEOLOGY, PERGAMON PRESS LTD, XX, vol. 2, no. 4, 1982, pages 355-365, XP002107865</p> <p>the whole document</p>	1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72
Y	<p>WO 94 13697 A (MAGAININ PHARMA)</p> <p>23 June 1994 (1994-06-23)</p> <p>example</p> <p>claims 3,7,37,41</p>	1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72
X	<p>US 5 217 998 A (HALLAWAY PHILIP E ET AL)</p> <p>8 June 1993 (1993-06-08)</p> <p>examples 3,8</p>	1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72
X	<p>SADRZADEH S M H ET AL: "THE LONG-ACTING PARENTERAL IRON CHELATOR, HYDROXYETHYL STARCH-DEFEROXAMINE, FAILS TO PROTECT AGAINST ALCOHOL-INDUCED LIVERINJURY IN RATS"</p> <p>JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY AND, US, vol. 280, no. 2, 1 February 1997 (1997-02-01), pages 1038-1042, XP002065956</p> <p>ISSN: 0022-3565</p> <p>page 1039</p> <p>figures</p>	1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 02/02928

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LESNEFSKY E J ET AL: "HIGH-DOSE IRON-CHELATOR THERAPY DURING REPERFUSION WITH DEFEROXAMINE-HYDROXYETHYL STARCH CONJUGATE FAILS TO REDUCE CANINE INFARCT SIZE" JOURNAL OF CARDIOVASCULAR PHARMACOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 16, no. 4, 1 October 1990 (1990-10-01), pages 523-528, XP002054497 ISSN: 0160-2446 tables figures</p>	<p>1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72</p>
X	<p>EP 0 315 349 A (YISSUM RES DEV CO) 10 May 1989 (1989-05-10)</p> <p>example 10</p>	<p>1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72</p>
X	<p>EP 0 304 183 A (BIOMED FRONTIERS INC) 22 February 1989 (1989-02-22)</p> <p>examples 3,8,9</p>	<p>1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72</p>
X	<p>WO 98 20905 A (SEABORN GEORGE STEPHEN ;HALLAWAY PHILIP E (US); DRAGSTEN PAUL R (U) 22 May 1998 (1998-05-22)</p> <p>examples claims</p>	<p>1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72</p>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP02/02928

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
**See supplemental Sheet additional matter pct/isa/210**
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## Continuation of Box I.2

Claims: 1, 2, 4, 5, 7-10, 16, 17, 55, 57, 58, 60-72 in part, and 3, 6, 10-15, 18-54, 56, 59

The current Claims 1-72 relate to a disproportionately large number of possible conjugates, to compositions containing such compounds, the uses thereof and to methods for the production thereof, of which only a small portion are supported by the description (PCT Article 6) and/or can be regarded as having been disclosed in the application (PCT Article 5). In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Therefore, the search was directed to the parts of the claims that appear to be supported and disclosed in the above sense, that is the parts relating to HAS protein conjugates and HAS nucleic acid conjugates.

The search initially yielded a very large number of documents detrimental to novelty. This number is so large that it becomes impossible to determine a subject matter in any of the claims for which protection might justifiably be sought (PCT Article 6). For these reasons too, a meaningful search covering the full range of the application appears impossible. The search was therefore limited to the conjugates indicated in the embodiments.

Given this large number of documents detrimental to novelty, an objection with respect to a lack of unity of invention should, in principle, also be raised. However, because the various inventions do not meet the requirements of PCT Article 5 and/or 6, it was decided merely to restrict the search.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT

Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/02928

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9949897	A	07-10-1999	AU 2918099 A CA 2326715 A1 WO 9949897 A1 CN 1301179 T EP 1066057 A1 JP 2002509898 T US 2002040128 A1	18-10-1999 07-10-1999 07-10-1999 27-06-2001 10-01-2001 02-04-2002 04-04-2002
WO 9801158	A	15-01-1998	DE 19628705 A1 AT 209931 T AU 710879 B2 AU 3541197 A BR 9710865 A CA 2258947 A1 DE 59705678 D1 DK 912197 T3 WO 9801158 A2 EP 0912197 A2 ES 2166551 T3 JP 2000514434 T PT 912197 T US 6083909 A	15-01-1998 15-12-2001 30-09-1999 02-02-1998 11-01-2000 15-01-1998 17-01-2002 18-03-2002 15-01-1998 06-05-1999 16-04-2002 31-10-2000 31-05-2002 04-07-2000
DE 3029307	A	04-03-1982	DE 3029307 A1	04-03-1982
WO 9413697	A	23-06-1994	AU 5741794 A CA 2151046 A1 EP 0672053 A1 JP 8504210 T WO 9413697 A1	04-07-1994 23-06-1994 20-09-1995 07-05-1996 23-06-1994
US 5217998	A	08-06-1993	US 4863964 A DE 3850002 D1 DE 3850002 T2 EP 0304183 A1	05-09-1989 14-07-1994 20-10-1994 22-02-1989
EP 0315349	A	10-05-1989	IL 84252 A AT 85223 T CA 1327936 A1 DE 3878157 D1 DE 3878157 T2 EP 0315349 A1 ES 2053757 T3 JP 2070703 A US 5064817 A	27-02-1994 15-02-1993 22-03-1994 18-03-1993 27-05-1993 10-05-1989 01-08-1994 09-03-1990 12-11-1991
EP 0304183	A	22-02-1989	US 4863964 A DE 3850002 D1 DE 3850002 T2 EP 0304183 A1 US 5217998 A	05-09-1989 14-07-1994 20-10-1994 22-02-1989 08-06-1993
WO 9820905	A	22-05-1998	AU 4876997 A WO 9820905 A2	03-06-1998 22-05-1998

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, DISSERTATION ABS, CANCERLIT, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>RICHTER A W ET AL: "ANTIBODIES AGAINST HYDROXYETHYLSTARCH PRODUCED IN RABBITS BY IMMUNIZATION WITH A PROTEIN-HYDROXYETHYLSTARCH CONJUGATE" INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND APPLIED IMMUNOLOGY, BASEL, CH, Bd. 52, Nr. 1-4, 1976, Seiten 307-314, XP008014084 ISSN: 0020-5915 Zusammenfassung Seite 308, linke Spalte, letzter Absatz -rechte Spalte, Absatz 1.</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	<p>1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72</p>

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. April 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

24/04/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Dullaart, A

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
Y	<p>WO 99 49897 A (HEMOSOL INC) 7. Oktober 1999 (1999-10-07)</p> <p>Beispiele Ansprüche</p>	<p>1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72</p>
Y	<p>WO 98 01158 A (FRESENIUS AG ET AL.) 15. Januar 1998 (1998-01-15) in der Anmeldung erwähnt</p> <p>Beispiel</p>	<p>1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72</p>
Y	<p>DE 30 29 307 A (FRESENIUS CHEM PHARM IND) 4. März 1982 (1982-03-04)</p> <p>Beispiele</p>	<p>1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72</p>
Y	<p>MAOUT ET AL: "Hydroxyethyl starch conjugated to human hemoglobin for use in blood transfusion: Comparison with dextran conjugates" CARBOHYDRATES AND CARBOHYDRATE POLYMERS: ANALYSIS, BIOTECHNOLOGY, CONFORMATION, MODIFICATION, ANTIVIRAL AND OTHER COMMERCIAL APPLICATIONS, XX, XX, Bd. 1, 1993, Seiten 132-140, XP002107867 Zusammenfassung Abbildungen Tabellen</p>	<p>1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72</p>
Y	<p>SAKAI H ET AL: "Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: Objective comparison between cellular and acellular types" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, Bd. 11, Nr. 1, 2000, Seiten 56-64, XP002957844 ISSN: 1043-1802 Zusammenfassung Abbildung 1 Seite 57, rechte Spalte, letzter Absatz -Seite 58, linke Spalte, Zeile 11 Tabelle 1 Abbildung 3</p>	<p>1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72</p>

-/--



## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>TOYAMA S ET AL: "Surface design of SPR-based immunosensor for the effective binding of antigen or antibody in the evanescent field using mixed polymer matrix"</p> <p>SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, Bd. 52, Nr. 1-2, 15. September 1998 (1998-09-15), Seiten 65-71, XP004157817</p> <p>ISSN: 0925-4005</p> <p>Seite 66, rechte Spalte, Absatz EXPERIMENTAL -Seite 67, linke Spalte</p> <p>Abbildung 1</p>	1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72
Y	<p>CERNY ET AL: "A hydroxyethyl starch - hemoglobin polymer as a blood substitute"</p> <p>CLINICAL HEMORHEOLOGY, PERGAMON PRESS LTD, XX, Bd. 2, Nr. 4, 1982, Seiten 355-365, XP002107865</p> <p>das ganze Dokument</p>	1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72
Y	<p>WO 94 13697 A (MAGAININ PHARMA)</p> <p>23. Juni 1994 (1994-06-23)</p> <p>Beispiel</p> <p>Ansprüche 3,7,37,41</p>	1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72
X	<p>US 5 217 998 A (HALLAWAY PHILIP E ET AL)</p> <p>8. Juni 1993 (1993-06-08)</p> <p>Beispiele 3,8</p>	1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72
X	<p>SADRZADEH S M H ET AL: "THE LONG-ACTING PARENTERAL IRON CHELATOR, HYDROXYETHYL STARCH-DEFEROXAMINE, FAILS TO PROTECT AGAINST ALCOHOL-INDUCED LIVERINJURY IN RATS"</p> <p>JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY AND, US, Bd. 280, Nr. 2, 1. Februar 1997 (1997-02-01), Seiten 1038-1042, XP002065956</p> <p>ISSN: 0022-3565</p> <p>Seite 1039</p> <p>Abbildungen</p>	1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72

-/--

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>LESNEFSKY E J ET AL: "HIGH-DOSE IRON-CHELATOR THERAPY DURING REPERFUSION WITH DEFEROXAMINE-HYDROXYETHYL STARCH CONJUGATE FAILS TO REDUCE CANINE INFARCT SIZE" JOURNAL OF CARDIOVASCULAR PHARMACOLOGY, NEW YORK, NY, US, Bd. 16, Nr. 4, 1. Oktober 1990 (1990-10-01), Seiten 523-528, XP002054497 ISSN: 0160-2446 Tabellen Abbildungen</p>	<p>1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72</p>
X	<p>EP 0 315 349 A (YISSUM RES DEV CO) 10. Mai 1989 (1989-05-10)</p> <p>Beispiel 10</p>	<p>1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72</p>
X	<p>EP 0 304 183 A (BIOMED FRONTIERS INC) 22. Februar 1989 (1989-02-22)</p> <p>Beispiele 3,8,9</p>	<p>1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72</p>
X	<p>WO 98 20905 A (SEABORN GEORGE STEPHEN ;HALLAWAY PHILIP E (US); DRAGSTEN PAUL R (U) 22. Mai 1998 (1998-05-22)</p> <p>Beispiele Ansprüche</p>	<p>1,2,4,5, 7-10,16, 17,55, 57,58, 60-72</p>

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 02/02928

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2. ☒ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,  
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
**siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210**
  
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgetaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

### Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1,2,4,5,7-10,16,17,55,57,58,60-72 in part, and 3,6,10-15,18-54,56,59

Die geltenden Patentansprüche 1-72 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Konjugate, sowie auf Zusammensetzungen die solche Verbindungen enthalten, deren Verwendungen, und auf Verfahren zu deren Herstellung, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Art.5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend HAS-Protein-Konjugate und HAS-Nukleinsäure-Konjugate.

Diese Recherche ergab in ihrer Anfangsphase schon eine sehr große Zahl neuheitsschädlicher Dokumente. Diese Zahl ist so groß, daß sich unmöglich feststellen lässt, für was in der Gesamtheit der Patentansprüche eventuell nach zu Recht Schutz begehrt werden könnte (Art. 6 PCT). Auch aus diesen Gründen erscheint eine sinnvolle Recherche über den gesamten Bereich der Patentansprüche unmöglich. Die Recherche wurde daher weiter beschränkt auf die Konjugate, die in den Ausführungsbeispielen angegeben sind.

Auf Grund dieser Zahl der neuheitsschädlichen Dokumenten musste in Prinzip ebenfalls einen Einwand wegen mangelnder Einheitlichkeit der Erfindungen. Weil aber die unterschiedliche Erfindungen nicht die Erfordernisse der Artikel 5 und/oder 6 PCT erfüllen wurde nur die Recherche eingeschränkt.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 02/02928

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9949897	A	07-10-1999	AU 2918099 A 18-10-1999
		CA 2326715 A1 07-10-1999	
		WO 9949897 A1 07-10-1999	
		CN 1301179 T 27-06-2001	
		EP 1066057 A1 10-01-2001	
		JP 2002509898 T 02-04-2002	
		US 2002040128 A1 04-04-2002	
WO 9801158	A	15-01-1998	DE 19628705 A1 15-01-1998
		AT 209931 T 15-12-2001	
		AU 710879 B2 30-09-1999	
		AU 3541197 A 02-02-1998	
		BR 9710865 A 11-01-2000	
		CA 2258947 A1 15-01-1998	
		DE 59705678 D1 17-01-2002	
		DK 912197 T3 18-03-2002	
		WO 9801158 A2 15-01-1998	
		EP 0912197 A2 06-05-1999	
		ES 2166551 T3 16-04-2002	
		JP 2000514434 T 31-10-2000	
		PT 912197 T 31-05-2002	
		US 6083909 A 04-07-2000	
DE 3029307	A	04-03-1982	DE 3029307 A1 04-03-1982
WO 9413697	A	23-06-1994	AU 5741794 A 04-07-1994
		CA 2151046 A1 23-06-1994	
		EP 0672053 A1 20-09-1995	
		JP 8504210 T 07-05-1996	
		WO 9413697 A1 23-06-1994	
US 5217998	A	08-06-1993	US 4863964 A 05-09-1989
		DE 3850002 D1 14-07-1994	
		DE 3850002 T2 20-10-1994	
		EP 0304183 A1 22-02-1989	
EP 0315349	A	10-05-1989	IL 84252 A 27-02-1994
		AT 85223 T 15-02-1993	
		CA 1327936 A1 22-03-1994	
		DE 3878157 D1 18-03-1993	
		DE 3878157 T2 27-05-1993	
		EP 0315349 A1 10-05-1989	
		ES 2053757 T3 01-08-1994	
		JP 2070703 A 09-03-1990	
		US 5064817 A 12-11-1991	
EP 0304183	A	22-02-1989	US 4863964 A 05-09-1989
		DE 3850002 D1 14-07-1994	
		DE 3850002 T2 20-10-1994	
		EP 0304183 A1 22-02-1989	
		US 5217998 A 08-06-1993	
WO 9820905	A	22-05-1998	AU 4876997 A 03-06-1998
		WO 9820905 A2 22-05-1998	